

Aus dem Medizinischen Labor Rostock (Ärztlicher Leiter: PD Dr. med. M. Steiner) und der Klinik für Innere Medizin III (Chefärztin: Dr. med. B. Krammer-Steiner), Klinikum Südstadt Rostock

**Klinische, hämostaseologische und molekulargenetische
Untersuchungen zum von Willebrand-Syndrom Typ 1**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Daniel Jenzen

geboren am 05.08.1981 in Schwerin

Rostock, August 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

PD. Dr. med. Michael Steiner, Medizinisches Labor Rostock

Prof. Dr. med. Volker Kiefel, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Transfusionsmedizin

Prof. Dr. med. Ralf Knöfler, Universitätsklinikum Dresden, Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendmedizin

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das von Willebrand-Syndrom: ein geschichtlicher Abriss	1
1.2 Klassifikation des von Willebrand-Syndroms	2
1.3 Diagnostik des von Willebrand-Syndroms	4
1.4 von Willebrand-Faktor: Synthese und Funktion	6
1.5 von Willebrand-Syndrom Typ 1	9
1.6 Ziel der Arbeit	9
2. Patienten und Methoden	10
2.1 Patienten	10
2.2 Erhebung der Blutungsanamnese	10
2.3 Labordiagnostik	10
2.3.1 Hämostaseologische Diagnostik	11
2.3.1.1 Bestimmung der Verschlusszeiten	11
2.3.1.2 Bestimmung der von Willebrand-Faktor Aktivität	12
2.3.1.3 Bestimmung des von Willebrand-Faktor Antigens	12
2.3.1.4 Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität	12
2.3.1.5 Multimeranalyse und Bestimmung der Collagenbindungskapazität	12
2.3.2 Molekulargenetische Diagnostik	13
2.3.2.1 Probenvorbereitung	13
2.3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.3.2.3 Agarosegelelektrophorese	14
2.3.2.4 Sequenzierung der DNA nach Sanger	14
2.3.2.5 Kapillarelektrophorese	15
2.3.2.6 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	15
2.3.3 Analyse der molekulargenetischen Varianten	16
2.3.3.1 AGVGD	16
2.3.3.2 MutationTaster2	17
2.3.3.3 SIFT	17
2.3.3.4 PolyPhen2	17
3. Ergebnisse	18
Patient Nr.01 – het.c.3692A>C; p. Asn1231Thr	18

Patient Nr.02 - het.c.2771G>A; p. Arg924Gln	19
Patient Nr.03 – het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	21
Patient Nr.04 - het.c.504insTATGACCCANGAAGG L168insX	22
Patient Nr.05 – het.c.4042_4062dup; p.Lys1348_Val1354dup	23
Patient Nr.06 - het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser	24
Patient Nr.07 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	26
Patient Nr.08 - het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	27
Patient Nr.09 1. het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31 2. het.c.6554G>A; p.Arg2185Gln	29
Patient Nr.10 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	30
Patient Nr.11 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	32
Patient Nr.12 - het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	33
Patient Nr.13 1. het.c.3686T>G; p.Val1229Gly 2. het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr	34
Patient Nr.14 1. het.c.3686T>G; p.Val1229Gly 2. het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr	36
Patient Nr.15 - het.c.7449C>G; p.Tyr2483*	37
Patient Nr.16 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	39
Patient Nr.17 - het.c.6187C>T; p.Pro2063Ser	40
Patient Nr.18 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	41
Patient Nr.19 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	43
Patient Nr.20 - het.c.1728G>T; p.Met576Ile	44
Patient Nr.21 - het.c.6221_6224dupCCAA; p.Lys2075ASnfs*16	46
Patient Nr.22 - het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg	47
Patient Nr.23 1. het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31 2. het.c.2561G>A; p.Arg854Gln	48
Patient Nr.24 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	49
Patient Nr.25 - het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser	51
Patient Nr.26 - het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg	52
Patient Nr.27 - het.2771G>A; p.Arg924Gln	54
4. Diskussion	58
4.1 Allgemeine Diskussion	58
4.2 Fallbezogene Diskussion	66
5 Zusammenfassung	81
6 Literaturverzeichnis	82
7 Anhang	90
7.1 Abkürzungsverzeichnis	90

7.2 Tabellenverzeichnis	92
7.3 Abbildungsverzeichnis	94
7.4 Selbständigkeitserklärung	96
7.5 Danksagung	97
7.6 Thesen	98

1. Einleitung

1.1 Das von Willebrand-Syndrom: ein geschichtlicher Abriss

Das von Willebrand-Syndrom (vWS) wurde erstmals von Erik Adolf von Willebrand 1926 beschrieben (Leebeek und Eikenboom 2016; Federici et al. 2011; Nilsson 1999). Damals wurde es zunächst hereditäre Pseudohämophilie genannt. Er beschrieb im Gegensatz zur Hämophilie, dass bei dieser Erkrankung keine Muskel- oder Gewebeblutungen stattfanden und Männer sowie Frauen gleichermaßen betroffen waren (Chapin 2018). Die verlängerte Blutungszeit war ein besonderes Merkmal. Er konstatierte, dass es sich um eine bisher unbekannte Form der Hämophilie handeln müsse. Zuvor beschrieb Lange in den 1850er Jahren bereits amerikanische und europäische Familien mit positiver Blutungsanamnese, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen waren. Diese Fälle wurden damals als Hämophilie gedeutet. Möglicherweise handelte es sich dabei jedoch um Patienten mit einem von Willebrand-Syndrom (Lassila und Lindberg 2013)

Die Indexpatientin war ein fünfjähriges Mädchen. Bei ihr führten bereits 1924 Anamnese und klinische Untersuchung sowie Laboruntersuchungen zur Diagnose einer offensichtlich vererbten Blutgerinnungsstörung. Von Willebrand hatte zunächst eine Thrombozytopathie in Kombination mit einer Gefäßwandschädigung vermutet.

Weitere Untersuchungen unternahm er vor Ort an Familienmitgliedern der Indexpatientin, welche auf den Åland-Inseln in der Ostsee lebte. Es zeigte sich bei vielen der Familienmitglieder eine positive Blutungsanamnese. Die Hälfte fiel mit Schleimhautblutungen auf. Auch über blutungsbedingte Todesfälle wurde berichtet. Diese neuen Erkenntnisse veröffentlichte von Willebrand 1926 (Lassila und Lindberg 2013; Federici et al. 2011; Nilsson 1999; Ruggeri und Zimmerman 1987).

In den 1930er Jahren wurden von Willebrands Erkenntnisse über die Pseudohämophilie durch von Jürgens bestätigt. Von Jürgens unternahm hierzu umfangreiche Untersuchungen an Bewohnern der Åland-Inseln. Im Ergebnis gab es mehrere Veröffentlichungen beider Autoren. Sie nahmen an, dass es sich um eine thrombozytäre Dysfunktion handeln müsse. Die

Erkrankung wurde fortan Willebrand-Jürgens-Thrombopathie genannt. Die Pathogenese konnte zu dem Zeitpunkt noch nicht geklärt werden. In den 1940er Jahren wurde die Erkrankung als Anerkennung für die umfangreichen Bemühungen ihres Erstbeschreibers in von Willebrand-Syndrom umbenannt (Lassila und Lindberg 2013; Nilsson 1999; Ruggeri und Zimmerman 1987).

Es dauerte weitere 30 Jahre, bis man erkannte, dass ein Plasmaprotein für die Blutgerinnungsstörung verantwortlich war. 1971 wurde der von Willebrand-Faktor (vWF) erstmals immunologisch nachgewiesen und als „FVIII-related antigen“ bezeichnet. Es wurde ein erstes Faktorenpräparat für therapeutische Ansätze hergestellt (Zimmerman et al. 1971). Seit 1985 hatte man den Faktor molekulargenetisch untersucht und seine Synthese sowie die Funktionen auf zellulärer Ebene im Detail geklärt (Federici et al. 2011). Es stellte sich heraus, dass das von Willebrand-Syndrom keine einheitliche Erkrankung ist und eine Unterteilung notwendig wurde.

1.2 Klassifikation des von Willebrand-Syndroms

Die erste systematische Klassifikation stammt von Ruggeri und Zimmerman aus dem Jahr 1987 mit der Einteilung in die Typen 1 bis 3 (Ruggeri und Zimmerman 1987). Die ISTH aktualisierte die Klassifikation zuletzt 2006 (Sadler et al. 2006).

Bei einem vWS Typ1 besteht definitionsgemäß ein partieller quantitativer Mangel an vWF. Klinisch zeigen sich in den meisten Fällen milde mukokutane Blutungen. Es zeigen sich keine Veränderungen der Multimere oder der Bindungsstellen des Proteins. Die Verschlusszeit ist als Hinweis einer gestörten primären Hämostase verlängert. Die von Willebrand-Antigen Konzentration (vWF:Ag), von Willebrand-Faktor Aktivität (vWF:Akt.) und die Faktor VIII-Aktivität sind leicht verringert oder im unteren Normbereich. Das vWS Typ1 wird in der Regel autosomal dominant vererbt. Grundlage hierfür sind Mutationen im vWF-Gen. Zahlreiche Mutationen sind bekannt. Sie sind heterogen und über das gesamte Gen verteilt (Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017; Leebeek und Eikenboom 2016; Sadler et al. 2006; Batlle et al. 2017). Zunehmend wird ein weiterer Subtyp des vWS Typ1 diskutiert. Hier zeigt sich eine erhöhte Clearance des vWF. Es kann eine erhöhte Konzentration des von Willebrand Faktor Propeptid (vWFpp) bei gleichzeitig erniedrigtem vWF:Ag gemessen werden. Zudem ist die Ratio aus vWF:Ag und vWF:Akt diagnostisch

wegweisend. Die Bezeichnung vWS Typ1c wurde vorgeschlagen (Leebeek und Eikenboom 2016).

Dem vWS Typ 2 A liegt ein qualitativer Defekt am vWF zugrunde. Es mangelt an den großen Multimeren (Solomon et al. 2011). So resultiert eine Störung der primären Hämostase mit verminderter Thrombozytenadhäsion, welche durch das Glykoprotein Ib (GPIb) vermittelt wird. Die Verschlusszeit ist verlängert. Die vWF Aktivität und ein erniedrigter Ristocetin-Cofaktor (VWF:RCo) oder eine verringerte Kollagen Bindungskapazität (vWF:CBA) sind typisch. Es erfolgt eine weitere Unterteilung in Subgruppen mit jeweils unterschiedlichen Pathomechanismen auf molekularer Ebene. Die Vererbung ist autosomal dominant oder rezessiv (Sadler et al. 2006; Leebeek und Eikenboom 2016; Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017).

Der Typ 2B von Willebrand-Syndrom entsteht durch eine mutationsbedingte erhöhte Affinität und Bindung des VWF an das GPIb der Thrombozyten (Mikhail et al. 2014). Grundlage sind sogenannte „Gain of function“-Mutationen im GPIb. Es kommt zur spontanen Bindung und Bildung von Thrombozytenaggregaten. Dadurch werden vor allem große Multimere und Thrombozyten verbraucht. Der vWF wird vermehrt durch ADAMTS13 gespalten. Es stellt sich eine erhöhte Ristocetin-induzierte Plättchenaggregation (RIPA) dar. Typisch ist eine Thrombozytopenie, die bei Trauma oder Stress aggraviert. Die Vererbung ist autosomal dominant (Sadler et al. 2006; Leebeek und Eikenboom 2016; Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017).

Der Typ 2M von Willebrand-Syndrom zeigt einen normalen Gehalt an großen Multimeren. Es zeigen sich Mutationen im vWF-Gen, die eine gestörte Interaktion mit GPIb sowie subendothelialen Strukturen wie Kollagen verursachen. Der Ristocetin Cofaktor (VWF:RCo) und/oder die Kollagen Bindungskapazität (VWF:CBA) sind im Verhältnis zu vWF:Ag erniedrigt. Das vWS Typ 2M wird autosomal dominant vererbt. Es besteht eine große Ähnlichkeit zum Typ 2A. Die Multimeranalyse ist hier diagnostisch wegweisend (Sadler et al. 2006; Leebeek und Eikenboom 2016; Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017).

Der Typ 2N von Willebrand-Syndrom zeigt eine verminderte Faktor-VIII Bindung (Rana et al. 2014). Die erste Beschreibung dieses Typs erfolgte bei einem Patienten aus der Normandie. Die Faktor VIII-Aktivität ist im Vergleich zum vWF:Ag überproportional verringert. Die Abgrenzung zur milden Hämophilie A ist problematisch. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die Mutationen liegen gewöhnlich im Bereich der Faktor VIII-Bindungsstelle zwischen den Aminosäuren Ser764 und Arg1035. Zur Abgrenzung wird die Faktor VIII-Bindung des vWF (vWF:FVIII) bestimmt. Die Vererbung erfolgt autosomal rezessiv bei homozygoten oder gemischt heterozygoten Mutationen (Sadler et al. 2006; Leebeek und Eikenboom 2016; Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017).

Das von Willebrand Syndrom Typ 3 zeigt einen (sub)totalen Mangel an VWF. Die vWF-Aktivität und der Faktor VIII-Aktivität sind gleichermaßen stark reduziert. Es handelt sich um einen Defekt der VWF-Synthese. vWF:Ag, vWF:RCo, vWF:CBA und FVIII:C sind deutlich verringert (Sadler et al. 2006; Leebeek und Eikenboom 2016; Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017; Michiels et al. 2005).

Das erworbene vWS (avWS) ist eine seltene Gerinnungsstörung. Die Patienten zeigen eine unauffällige Familienanamnese. Häufig tritt das erworbene vWS im Zusammenhang mit lympho- oder myeloproliferativen Erkrankungen auf. Es zeigt sich auch bei kardiovaskulären, autoimmunen und malignen Erkrankungen. Bei den Untersuchungen fallen verringerte vWF:Ag, VWF: RCo und FVIII:C Werte auf. Die Multimere können unauffällig sein. Es können aber auch die großen Multimere wie beim vWS Typ 2A fehlen. Als ein möglicher Pathomechanismus wird eine erhöhte Clearance des vWF diskutiert. Hier spielen Autoantikörper eine Rolle, welche mit der mit der Plättchen- oder Kollagenbindung interferieren (Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017; Bartoli et al. 2015).

1.3 Diagnostik des von Willebrand-Syndroms

Das von Willebrand-Syndrom ist die häufigste hereditäre Gerinnungsstörung. Gerinnungsbefunde unterhalb des Normbereiches findet man bei etwa 1% der Gesamtbevölkerung. Ein echtes vWS jedoch ist wesentlich seltener (1:10.000) (Federici et al. 2011; Echahdi et al. 2017). In der Regel stellen sich die Patienten mit Blutungssymptomen

vor. Typisch sind mukokutane Blutungen. Es ist von großer Bedeutung, diese Symptome richtig einzuordnen und eine sorgfältige Anamnese ist unabdingbar. Der spontane Charakter, die Schwere und Lokalisation der Blutungen werden erfasst. Dafür sind standardisierte Fragebögen entwickelt worden, um die Symptome zu objektivieren (Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017).

Wenn sich der klinische Verdacht auf eine Gerinnungsstörung und insbesondere der Verdacht auf ein von Willebrand-Syndrom verdichtet, folgt eine differenzierte Labordiagnostik in mehreren Stufen.

Der von Willebrand Faktor ist ein multimerisiertes und multifunktionales Glykoprotein. Das Eiweiß ist unterteilt in Domänen mit Bindungsstellen für Interaktionspartner. Da das von Willebrand Syndrom auf einem qualitativen oder quantitativen Mangel an vWF beruht, ist für die korrekte Diagnose mehr als nur ein Labortest etabliert. (Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi 2017; Echahdi et al. 2017) Als Screening eignet sich die Verschlusszeit (z.B. PFA-100 System), und die Messung der Thrombozytenzahl.

Die Bestimmung der Verschlusszeiten mit dem PFA-100 System gibt ein Abbild der primären Hämostase. Störungen gehen mit einer verlängerten Verschlusszeit einher. Neben thrombozytären Störungen können vWF Mangelzustände erkannt werden. Die Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) ist kein spezifischer Test für ein vWS. Eine verlängerte aPTT kann jedoch auf einen Faktor VIII-Mangel, ein vWS Typ2N oder vWS Typ3 hinweisen. Darüber hinaus findet man eine verlängerte aPTT bei zahlreichen anderen Erkrankungen wie zum Beispiel: Hämophilie A und B, Faktor XI - oder XII – Mangel sowie Lupus Antikoagulanzen. Die aPTT Bestimmung ist nicht geeignet für Diagnostik einer milden Hämophilie oder eines vWS Typ1.

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl im peripheren Blut gehört hingegen zur Routinediagnostik. (Federici et al. 2011)

Die weiterführende Labordiagnostik beinhaltet die Bestimmung des von Willebrand-Faktor Antigens (vWF: Ag), der von Willebrand-Faktor Aktivität (vWF: Akt), des Ristocetin Cofaktors (vWF:RCo), der Kollagenbindungskapazität (vWF:CBA), der Faktor VIII-Aktivität (FVIII:C), der von Willebrand-Faktor – Faktor VIII-Bindung (vWF:FVIIIIB), der Ristocetin induzierte Plättchenaggregation (RIPA) und des von Willebrand-Faktor Propeptids (vWF:pp) sowie der Multimeranalyse.

1.4 von Willebrand-Faktor: Synthese und Funktion

Der von Willebrand-Faktor ist ein großes multimerisiertes Glykoprotein. Die Synthese erfolgt in den Megakaryozyten und den Endothelzellen (Chapin 2018). Bei einer Gefäßverletzung vermittelt der von Willebrand-Faktor die Thrombozytenadhäsion an das subendotheliale Gewebe. Als Transportprotein für den Gerinnungsfaktor VIII wird dieser vor einer Proteolyse geschützt (James und Lillicrap 2012). Erst seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass Faktor VIII und von Willebrand-Faktor unterschiedliche Proteine sind. Bis dahin wurde der von Willebrand-Faktor als Faktor VIII-assoziiertes Antigen bezeichnet (Ruggeri und Zimmerman 1987). Darüber hinaus entdeckte man ein von Willebrand-Faktor Antigen 2, welches heute als von Willebrand-Faktor Propeptid bezeichnet wird. Das Propeptid besteht aus einer Sequenz von 741 Aminosäuren, welche nach der Synthese des von Willebrand Faktors durch Furin abgespalten wird und dann in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und in den Alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert wird (Ruggeri und Zimmerman 1987).

Das von Willebrand Faktor-Gen wurde 1985 erstmalig entschlüsselt (Peake und Goodeve 2007). Es befindet sich auf Chromosom 12 und besteht als außergewöhnlich großes Gen aus 52 kodierenden Exons mit einer Gesamtgröße von 178 Kb (Chapin 2018; Ng und Di Paola 2018).

Inzwischen hat man zahlreiche Mutationen im vWF-Gen gefunden und den unterschiedlichen Subtypen der Erkrankung zugeordnet (Abbildung 1).

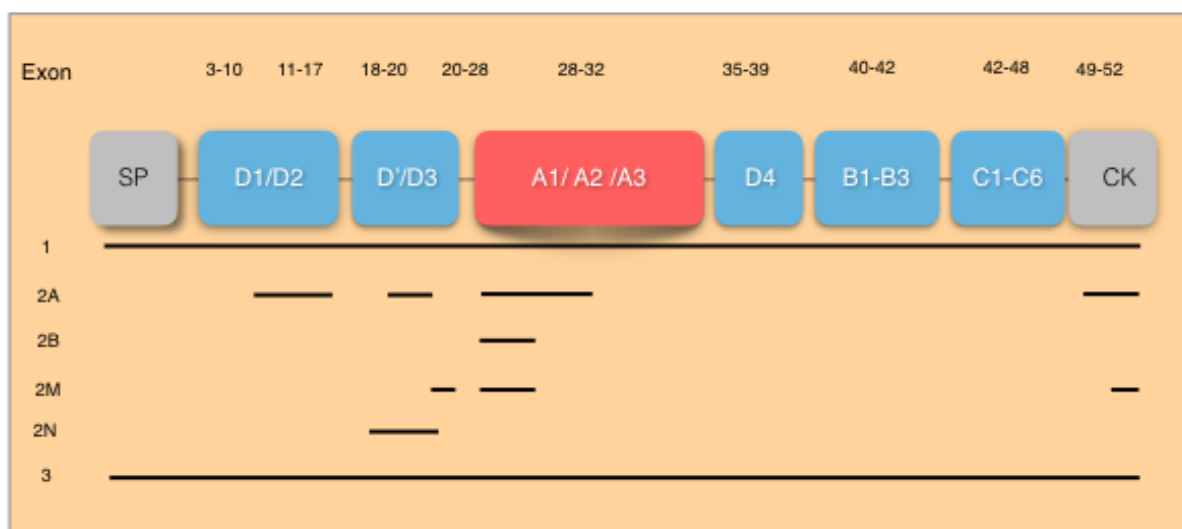


Abbildung 1: Domänenstruktur des vWF-Proteins. Zuordnung der Exons und Verteilung der Mutationen für die Subtypen vWS 1-3 (modifiziert nach (James und Lillicrap 2013)).

Es gibt auf Chromosom 22 ein so genanntes Pseudogen mit einer 97-prozentigen Homologie zum aktiven Gen. Es enthält mehrere Stoppkodons und wird beim Menschen nicht exprimiert. Das Leseraster des von Willebrand-Faktor Gens ergibt eine Sequenz von 2813 Aminosäuren (Ng und Di Paola 2018) für die Vorstufe eines von Willebrand-Faktor Monomers. Der sogenannte Präpro-von Willebrand-Faktor besteht aus einem 22 Aminosäuren langen Signalpeptid, gefolgt von einem 741 Aminosäuren umfassenden Propeptid und dem 2050 Aminosäuren langen reifen Protein (Ng und Di Paola 2018). Sogenannte Proteindomänen bestehen aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen. Diese Domänen werden mit den Buchstaben A, B, C und D bezeichnet. Den unterschiedlichen Domänen sind jeweilige Funktionen zugeordnet (Ng und Di Paola 2018). Die D' D3 Domäne ist für die Faktor VIII-Bindung notwendig. Die A1-Domäne vermittelt die Thrombozytenbindung über GPIIb α und Kollagen. Im Bereich der A2-Domäne befindet sich die Bindungsstelle für ADAMTS 13. Die A3-Domäne ist wichtig für die Kollagenbindung. Die C1 Domäne enthält die Sequenz RGDS für die Bindung an GPIIb/IIIa. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids durch das Enzym Furin. Das Propeptid und das reife Protein enthalten zahlreiche Cysteinreste. Diese Aminosäure wird für die Ausbildung von Disulfidbrücken benötigt. Die CK-Domäne liegt am carboxyterminalen Ende des Proteins. Hier werden besonders viele Disulfidbrücken ausgebildet. Es kommt zur Verknüpfung von zwei Monomeren (Dimerisation). Außerdem wird die Proteinkette gefaltet und stabilisiert.

Zusätzlich werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) Kohlenhydratseitenketten angefügt. Hierunter befinden sich auch AB0-Blutgruppen Oligosaccharide. Sowohl die Glykosylierung als auch die korrekte Faltung sind wichtige Vorgänge für die Dimerisation. Die Freisetzung der Dimere aus dem ER ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese.

Der nächste wichtige Schritt ist die Multimerisation und findet im Golgi-Apparat der Zelle statt. Die Dimere werden über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Nach diesem Prinzip erfolgt die Synthese der von Willebrand-Faktor Multimere (Abbildung 2). Die Speicherung erfolgt in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzelle und in den thrombozytären Alpha-Granula. Es gibt eine kontinuierliche basale Freisetzung des von Willebrand-Faktors und die regulierte Freisetzung. Diese kann experimentell z.B. mit Thrombin ausgelöst werden. In vivo sind die Auslöser z.B. körperliche Anstrengung, Epinephrin oder DDAVP. So kommt es kurzfristig zu einem Anstieg der vWF-Konzentration. Die großen vWF-

Multimere haben eine Halbwertszeit von zirka 12 Stunden. Das Propeptid hingegen hat eine Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden.

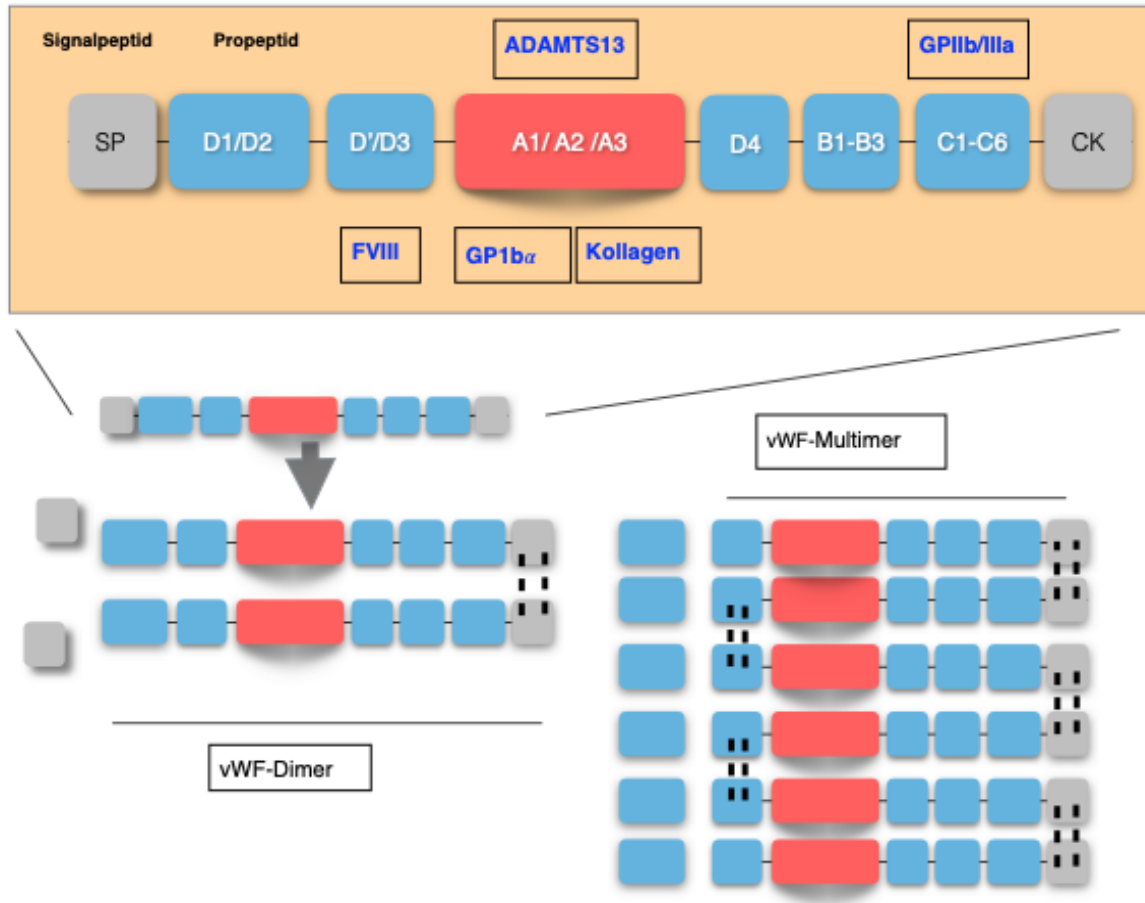


Abbildung 2: Domänenstruktur des vWF sowie der Bindungsstellen molekularer Interaktionspartner. Weiterhin schematische Darstellung der Dimerisation und Multimerisation des Proteins (gestrichelte Linien) über Disulfidbrücken (modifiziert nach James und Lillicrap 2013).

Eine wichtige Funktion des von Willebrand Faktors ist die Bindung an Kollagen der subendothelialen Matrix. Es erfolgt außerdem die Bindung an Thrombozyten über die GP1b Rezeptoren und es resultiert eine Plättchenaggregation über Fibrinogen Brücken.

Eine weitere wichtige Funktion ist der Transport vom Faktor VIII. Die Halbwertszeit von Faktor VIII beträgt 12 bis 15 Stunden, wenn er an den von Willebrand-Faktor gebunden ist. Ist das nicht der Fall, verkürzt sich die Halbwertszeit aufgrund der proteolytischen Anfälligkeit des Faktor VIII auf zwei Stunden. Die Bindungsstelle für Faktor VIII liegt in der D3-Domäne. (James und Lillicrap 2012)

1.5 von Willebrand-Syndrom Typ 1

Das von Willebrand-Syndrom stellt die häufigste hereditäre Blutgerinnungsstörung dar. Etwa 70-75 % der Patienten weisen ein Typ 1 von Willebrand Syndrom auf. Allgemein liegt hier eine Störung der Synthese, der Freisetzung oder der Halbwertszeit des von Willebrand-Faktors vor. Es resultiert ein quantitativer Defekt des von Willebrand-Faktors. (James und Lillicrap 2012)

Das von Willebrand-Syndrom Typ 1 ist eine monogene dominant vererbte Anlage. Heute weiß man jedoch, dass zusätzliche genetische Varianten modifizierend eine Rolle spielen. Phänotypisch zeigt sich eine leicht verringerte von Willebrand-Faktor Konzentration und Aktivität bei vollständig erhaltener Funktionalität. Die häufigste Ursache für die Entstehung eines Typ 1 von Willebrand Syndroms ist ein Defekt in der Synthese des von Willebrand Faktors. Einige Mutationen bedingen eine Störung der Freisetzung des von Willebrand Faktors. Eine weitere Möglichkeit der Pathogenese besteht in einer erhöhten Clearance bzw. einer verkürzten Halbwertszeit (James und Lillicrap 2012). In den Laborbefunden zeigt sich eine verlängerte Verschlusszeit bei normwertigen Thrombozytenzahlen. Darüber hinaus ist das vWF-Antigen und die -Aktivität, die Faktor VIII-Aktivität und die Kollagen Bindungsaktivität leicht erniedrigt oder im unteren Referenzbereich. Man findet in der Regel keine pathologischen Veränderungen in der Multimeranalyse (Sadler et al. 2006).

1.6 Ziel der Arbeit

Ausgehend von der bekannten Heterogenität des vWS Typ1 sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Diagnostik von der Erstvorstellung in der Ambulanz mit Anamneseerhebung (Klinik/ Symptomatik) über die hämostaseologischen Befunde (Phänotyp) bis zur Bewertung und Einordnung molekulargenetischer Befunde (Genotyp) bei Patienten mit einem vWS Typ1 dargestellt werden.

Es sollten sowohl konvergente als auch divergente Befunde aus Klinik und Labor veranschaulicht und kritisch diskutiert werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die molekulargenetischen Befunde und deren Interpretation inklusive der Pathogenitätsanalyse gelegt.

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Es handelt sich um eine retrospektive Analyse von 27 Patienten im Alter von 14 bis 70 Jahren. 25 von 27 Patienten hatten eine auffällige Blutungsanamnese. Alle Patienten stellten sich zur Abklärung in der hämostaseologischen Sprechstunde am Klinikum Südstadt Rostock vor. Bis auf eine Patientin waren alle anderen Patientinnen und Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung volljährig. Insgesamt wurden zwei männliche und 25 weibliche Patienten untersucht und ausgewertet. Bei allen Patienten wurde ein von Willebrand Syndrom Typ 1 diagnostiziert. Die Analyse der entnommenen Blutproben erfolgte im Medizinischen Labor Rostock und im Asklepios Gesundheitszentrum Labor Hamburg Altona. Die molekulargenetischen Untersuchungen und deren Interpretation wurden im MVZ für Humangenetik und Molekularpathologie Rostock vorgenommen. Anamnestische Informationen sowie die Laborergebnisse wurden den Krankenakten entnommen. Es erfolgte keine erneute Befragung oder Untersuchung der Patienten oder deren Blutproben. Die einzelnen Kasuistiken sind im Ergebnisteil detailliert dargestellt.

2.2 Erhebung der Blutungsanamnese

Die Kenntnis von Blutungssymptomen ist bei Patienten mit Verdacht auf ein von Willebrand-Syndrom von großer Bedeutung. Die Symptome wurden in einem persönlichen Gespräch durch einen erfahrenen Hämostaseologen eruiert. Zusätzlich wurde ein standardisierter Fragebogen vom Patienten ausgefüllt. Ziel war die korrekte Einordnung der Symptomatik und Indikationsstellung der weiterführenden Diagnostik.

2.3 Labordiagnostik

Bei allen Patienten erfolgte bei Erstvorstellung in der Ambulanz eine Routinelabordiagnostik im Medizinischen Labor Rostock. Diese beinhaltete in jedem Fall ein Blutbild, die Blutgruppe, das CrP, die Verschlusszeit, vWF:Ag und vWF:Akt, Faktor VIII-Aktivität sowie eine Multimeranalyse mit CBA. Bezüglich der Blutgruppe erfolgte eine Deklaration als Blutgruppe 0 beziehungsweise Nicht 0. Wenn die Befunde für ein vWF Typ1 sprachen, wurde die molekulargenetische Analyse veranlasst.

2.3.1 Hämostaseologische Diagnostik

2.3.1.1 Bestimmung der Verschlusszeiten

Nachfolgend wird das Prinzip der Analyse der primären Hämostase erklärt.

Durch eine Kapillare wird das citrat-antikoagulierte venöse Blut zur Membran transportiert. Die Membran ist mit Kollagen, Epinephrin oder ADP beschichtet. Durch den Kontakt des Blutes mit der Membran wird die primäre Hämostase eingeleitet. Es werden hohe Scherkräfte beim Durchtritt des Blutes durch die Kapillare erzeugt. Hierdurch werden die von Willebrand Multimere derart verändert, dass viele Bindungsstellen für Thrombozyten frei werden. Die Thrombozyten adhärieren initial über von Willebrand Faktor an Kollagen. Es kommt zur Thrombozytenaktivierung. Weitere Thrombozyten aggregieren und der entstehende Thrombus verengt die Öffnung der Kapillare, bis der Blutfluss zum Erliegen kommt. (Abbildung 3) Die Zeit vom ersten Kontakt des Blutes mit der Membran bis zum Erliegen des Blutflusses wird als Verschlusszeit (VZ) bezeichnet. Die VZ ist ein Indikator für die Thrombozytenfunktion und ist abhängig von der Thrombozytenzahl und dem Hämatokrit sowie dem vWF. Zum Screening auf eine Thrombozytendysfunktion oder ein vWS wird die Kollagen/Epinephrin-Messzelle verwendet. Ist hier die VZ verlängert, wird die Kollagen/ADP-Messzelle verwendet. Der Messwert wird in Sekunden angegeben.

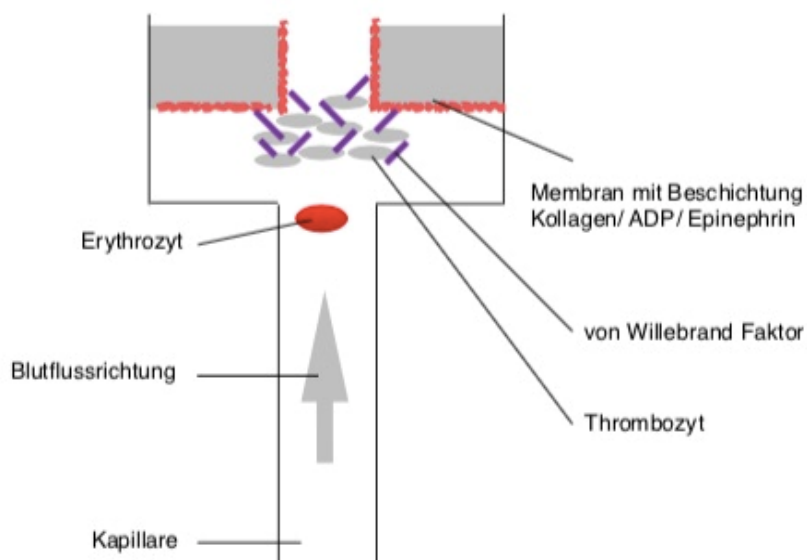


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Messprinzips der Verschlusszeit mit dem PFA 100 System.

2.3.1.2 Bestimmung der von Willebrand-Faktor Aktivität

Es wird ein latexverstärkter Immunoassay zur Bestimmung der von Willebrand-Faktor Aktivität im Plasma durchgeführt (HemosIL™ von Willebrand-Factor Activity). Hierfür wird das vorbereitete Latexreagenz verwendet. Dieses enthält einen monoklonalen Antikörper gegen die GPIb Bindungsstelle des von Willebrand-Faktors (Maus Anti VWF monoklonaler Antikörper). Proportional zur von Willebrand-Faktor Aktivität (Anzahl der freien Bindungsstellen an den Multimeren) kommt es zur Agglutination und Trübung des Reagenzes. Diese Trübung führt zu einer messbaren Abnahme der Lichtdurchlässigkeit bei 405nm. Sie wird photometrisch gemessen und anhand von Kontrollplasmen ein Messwert bestimmt. Der Referenzbereich lag zwischen 40% und 126%.

2.3.1.3 Bestimmung des von Willebrand-Faktor Antigens

Wie bei der VWF Aktivitätsbestimmung handelt es sich um einen latexverstärkten Immunoassay. Bei Anwesenheit von vWF:Ag kommt es zur Agglutination mit den Latexpartikeln und zur Abnahme der Lichtdurchlässigkeit. Die Messung erfolgt bei 405nm. Die Agglutination nimmt proportional zur vWF:Ag Konzentration zu. Der Referenzbereich lag zwischen 42% und 141%.

2.3.1.4 Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität

Die Methode entspricht dem Einstufentest für die Einzelfaktorbestimmung. Zum Einsatz kommt ein Mangelplasma, welches eine Faktor VIII-Aktivität von maximal 1% hat. Der Faktor VIII-Mangel wird bei der Herstellung durch Immunabsorption herbeigeführt. Alle übrigen Faktoren sind in physiologischer Konzentration vorhanden.

Es wird die Patientenprobe (Citratplasma) mit dem Mangelplasma gemischt und die Gerinnungszeit in einem aPTT System bestimmt. Proportional zur Faktor VIII-Aktivität in der Patientenprobe verkürzt sich nun die Gerinnungszeit. Die Menge an Faktor VIII kann anhand einer Kalibrationskurve bestimmt werden. Nachgewiesen wird die Fibrinbildung, welche die Lichtstreuung erhöht und photometrisch registriert wird.

2.3.1.5 Multimeranalyse und Bestimmung der Collagenbindungskapazität

Die Multimeranalyse und die Bestimmung der Collagenbindungskapazität erfolgte in im Asklepios Gesundheitszentrum Labor Hamburg Altona. Hierfür wurde jeweils Citratplasma

versandt. Das Testprinzip soll hier nicht im Detail erläutert werden, ist aber von Budde und Kollegen 2008 veröffentlicht worden (Budde et al. 2008).

2.3.2 Molekulargenetische Diagnostik

2.3.2.1 Probenvorbereitung

Dem Patienten wird venöses EDTA-antikoaguliertes Blut entnommen und genomische DNA extrahiert (QIA amp. DNA Blood Mini Kit, Firma QIAGEN).

2.3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion werden die 52 Exons des von Willebrand-Faktor Gens für die anschließende Sequenzierung vervielfältigt (Amplifikation). Es werden jeweils das Exon und etwa 20 Basenpaare vor Beginn und nach Ende des Exons (Intron/ Exon Übergänge) amplifiziert. Für den Start der PCR werden spezifische Primer entworfen. Primer sind kurze (20-30 bp) komplementäre Nukleinsäuresequenzen, welche an die DNA spezifisch binden und den Startpunkt der Synthese darstellen. Die Primer werden mit der Software Primer 3 aufgrund der Kenntnis der Sequenz der Exons entworfen. Es gibt für jedes Exon jeweils einen forward und reverse Primer für die komplementären Nukleinsäurestränge. Das korrekte Primerdesign ist bedeutsam, um eine Amplifikation des in der Sequenz sehr ähnlichen Pseudogens zu vermeiden. Aufgrund der Größe wird Exon 28 in drei PCR-Reaktionen aufgeteilt. Für kurze, aufeinanderfolgende Exons erfolgt jeweils eine PCR (Exon 23/24, 29/30 und 39/40).

96 Well Platten der Firma Eppendorf werden mit einheitlich 2,0 µl DNA-Eluat befüllt. Jetzt werden zunächst 4,5 µl 360° Taq ABI Master Mix hinzugefügt. Dann kommt Magnesiumchlorid und die thermostabile DNA-Polymerase hinzu. Zuletzt werden die Primer hinzugefügt. Nun werden die Platten in den Mastercycler der Firma Eppendorf verbracht, wo die Reaktion abläuft. Es finden 30 PCR-Zyklen statt.

Zunächst wird die DNA bei einer Temperatur von 92°C denaturiert und dadurch weichen die komplementären Stränge auseinander. Nun wird auf 55°C herabgekühlt und es können die spezifischen Primer (forward und reverse) an die DNA-Abschnitte binden (Annealing bzw. Hybridisierung). Bei 72°C kann nun die Polymerase aus den vier Basen Cytosin, Guanin, Adenin und Thymin den jeweils komplementären Strang synthetisieren. Die Länge des

Nukleinsäurestranges limitiert sich selbst. Durch das erneute Aufheizen auf 92°C erfolgt wieder die Denaturierung. Das PCR-Produkt löst sich und ein neuer PCR-Zyklus beginnt.

2.3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Mit der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren mit einer Größe von 50 bp bis 100 kbp aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hier wird eine Probe der amplifizierten DNA Abschnitte auf Agarosegel aufgetragen und es kommt zu einer Wanderung der Nukleinsäurestränge im elektrischen Feld. Neben den PCR-Produkten wird eine Standardprobe aufgetragen, um anhand der Banden die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen.

2.3.2.4 Sequenzierung der DNA nach Sanger

Zur Vorbereitung der Sequenzierung folgt eine Aufreinigung der Proben. Unverbrauchtes Material wird aus der Probe entfernt. Hierfür sind eine alkalische Phosphatase, eine Exonuklease und Pufferflüssigkeit notwendig. Zunächst wird die Probe auf 85°C erhitzt und dann auf 37°C abgekühlt.

Die gereinigte DNA-Probe wird nun einer Cycle-PCR-Reaktion zugeführt. Die Probe wird mit Reagenzien vorbereitet. Man kombiniert jeweils 0,2µl Big Dye Terminator Mastermix sowie 2,0µl Sequenzierpuffer, 5,8µl Wasser und 1,0µl Primer. Bei dieser Reaktion kommt der für das jeweilige Exon spezifische forward oder reverse Primer zum Einsatz, so dass die komplementären Einzelstränge der Exons amplifiziert werden. Der Mastermix enthält neben den dNTP's (Deoxynucleotidphosphat) sogenannte ddNTP's (Dideoxynucleotidphosphat). Das sind künstlich veränderte Basen, denen die 3'-Hydroxygruppe fehlt. Werden diese eingebaut, kann keine Verknüpfung mit der Phosphatgruppe der nächsten Base über die Polymerase erfolgen und es kommt zum Kettenabbruch (Kettenabbruchmethode). Zudem ist an jede der vier Basen ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Es entsteht also in der Cycle PCR eine Mischung aus unterschiedlich langen Nukleinsäureketten. Am Anfang findet sich der Primer und an deren Ende befindet sich eine der vier ddNTP welche den Kettenabbruch verursacht hat. Nun erfolgt eine erneute Reinigung der Proben mit Ethanol für 15 Minuten.

2.3.2.5 Kapillarelektrophorese

Der eigentliche Sequenznachweis findet im Genetic Analyzer 3130x (Applied Biosystems) statt. Das erfolgt nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Die fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure Stränge wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung durch die Kapillare und strömen an einem Laser vorbei. Dieser regt den jeweiligen Farbstoff zur Fluoreszenz an, welche detektiert wird. Für jeden Nukleinsäure Strang ist die Startsequenz (Primer) bekannt. Da jeder Strang mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP endet, kann man so die Sequenz ablesen. Es werden jeweils 20 Basen vor und nach dem eigentlichen Exon (Intron-Exon-Übergänge) sequenziert. Die Auswertung erfolgt mit der Software Sequence Pilot Version 4.22 (JSI Medical Systems). Es wird die gesamte Sequenz durchgemustert und jede Variante wird einzeln bewertet. Die Software Alamut wird benutzt um eine Literaturrecherche durchzuführen. Hier besteht Zugriff auf die HGMD Datenbank (Database of human gene mutation data) oder auf die von Willebrand Factor Variant Database der EAHAD (The European Association for Haemophilia and Allied Disorders).

2.3.2.6 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Es besteht auch die Möglichkeit, dass größere Abschnitte des vWF-Gens verändert sind, welche dem Nachweis mit der Sanger-Sequenzierung entfallen (Deletionen/Duplikationen). Für diesen Nachweis ist die MLPA-Analyse notwendig. Diese wird zusätzlich bei jeder Probe durchgeführt.

MLPA ist die Abkürzung für Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Mit dieser Technik ist es möglich, Mengenunterschiede eines definierten DNA-Abschnitts nachzuweisen. Dazu zählen Deletionen und Duplikationen einzelner Exons aber auch ganzer Gene. So können auf diese Weise heterozygote und homozygote Deletionen sowie Duplikationen in krankheitsspezifischen Genen identifiziert werden.

Die Durchführung der MLPA-Analyse erfolgt in zwei Abschnitten. Zunächst wird in einem ersten Schritt ein Sondenpaar an die DNA-Matrix hybridisiert. Dabei sind die Sequenzen der Sonden so gewählt, dass sie direkt nebeneinander im Genabschnitt liegen und durch eine Ligase verknüpft werden können. In einem zweiten Schritt können diese ligierten Sondenabschnitte mittels PCR amplifiziert werden. Fehlen bestimmte DNA-Abschnitte (beispielsweise durch Deletionen), so können sich die Sondenabschnitte nicht zusammenlagern und es kann dementsprechend kein PCR-Produkt amplifiziert werden. An

duplizierte DNA- Abschnitte lagern sich doppelt so viele Sondenabschnitte zusammen und die Konzentration an PCR-Produkt nimmt dementsprechend zu.

2.3.3 Analyse der molekulargenetischen Varianten

Die Identifizierung von genetischen Varianten und ihre Bewertung als Mutation ist von zentraler Bedeutung, weil viele Mutationen in krankheitsverursachenden oder potentiell krankheitsverursachenden Genen gefunden werden. Die Pathogenitätsanalyse von Varianten auf DNA- und Proteinebene ist die Domäne der Bioinformatik. Es existiert eine Vielzahl von Programmen unterschiedlicher Komplexität. Die Programme werden kontinuierlich überarbeitet und verbessert. Jede Software ist für eine konkrete Fragestellung konzipiert. Die unten aufgeführten Programme können einen Einzelbasen- oder Aminosäureaustausch gut interpretieren. Für größere Mutationen oder Kettenabbrüche sind sie dagegen nicht geeignet. Für die vorliegende Arbeit wurden die Programme aGVGD, SIFT, Mutation Taster2 und Polyphen2 (Prediction Tools) benutzt. Um die Ergebnisse in eine Gesamtbewertung zu integrieren wurde die Software Alamut visual benutzt. Diese Software ist das Bindeglied zwischen Prediction Tools und Mutations- sowie Literaturdatenbanken. Hier sind im Ergebnisteil jeweils exemplarisch Sequenzausschnitte eingefügt worden. Es wurden zudem die Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse in Tabellenform dargestellt. Zur besseren Verständlichkeit wurden neben der Angabe der Scorewerte die Ergebnisse als pathogen oder nicht pathogen deklariert. Die Prinzipien sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

2.3.3.1 AGVGD

Das Programm vergleicht die durch die Variante veränderte Sequenz mit mehreren Sequenzen ohne Mutationen (Multi Sequenz Analyse (MSA)). Zunächst wird eine Aussage über die physikochemischen Unterschiede betroffener Aminosäuren getroffen. Das wird als Grantham Variation (GV) bezeichnet. Das heißt, es wird eine MSA für eine definierte Aminosäureposition durchgeführt. Dann entscheidet sich, ob die veränderte Aminosäure physikochemisch ähnlich ist oder signifikant abweicht (Grantham Distance (GD)). Für beide wird ein Scorewert angegeben. Zum Schluss werden beide Scores miteinander verknüpft.

Zusammengefasst kann man belegen, ob die veränderte Aminosäure physikochemisch stark von der Standardabweichung entfernt ist und als Mutation möglicherweise pathogen ist ({Adzhubei 2010 #45}).

2.3.3.2 MutationTaster2

Mutation Taster2 ist ein Web-basiertes Instrument, um die funktionellen Unterschiede auf Proteinebene, die durch Veränderungen der DNA-Sequenz entstehen, vorherzusagen. Hierzu wird ein Abgleich mit mehreren Datenbanken vorgenommen. Es beinhaltet Informationen zu Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) ebenso wie bekannte Insertionen und Deletionen (indels) aus dem 1000 Genom-Projekt oder die Datenbanken ClinVar und HGMD public. Veränderungen der DNA-Sequenz werden hier von neutral bis krankheitsverursachend bewertet. (Schwarz et al. 2014)

2.3.3.3 SIFT

SIFT ist ein Software Tool, welches eine Aussage zur Protein-/ Aminosäurekonservierung erlaubt. Die Substitution einer Aminosäure an einer Position in der Sequenz wird durch Non Synonymous Single Nucleotide Polymorphism (nsSNP) hervorgerufen. Die veränderte Aminosäuresequenz kann die Funktion des Proteins und somit den Phänotyp verändern und bekommt dadurch Krankheitswert. Sorting Tolerant From Intolerant (SIFT) ist ein Algorithmus, welcher vorhersagen kann, ob eine Aminosäuresubstitution die Funktion des Proteins beeinflusst. Man kann davon ausgehen, dass wichtige Positionen in der Aminosäuresequenz von Proteinen im Laufe der Evolution konserviert wurden, weil sie für eine korrekte Funktion des Proteins essentiell sind und nicht verändert werden dürfen. Die Software vergleicht eine Proteinsequenz mit homologen Sequenzen von Bakterien, Pflanzen oder Tierarten und kann praktisch für jede Position und besonders für veränderte Positionen einen Scorewert berechnen, der angibt, wie stark die Position konserviert ist und ob die Veränderung die Proteinfunktion verändert und somit Krankheitswert hat oder nicht. Ein Scorewert von kleiner als 0,05 gilt hier als Grenze zum Pathologischen. (Ng und Henikoff 2003)

2.3.3.4 PolyPhen2

PolyPhen2 ist eine weitere Software, welche von der Harvard Universität betrieben wird. Sie sagt die Einflüsse von nsSNPs auf die Proteinstruktur und Funktion vorher. (Adzhubei et al. 2013)

3. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Befunde aller Patienten in einheitlicher Art und Weise dargestellt. Nach der Blutungsanamnese (Klinik/Symptomatik) folgt die Labordiagnostik (Phänotyp) sowie die molekulargenetische Diagnostik (Genotyp).

Patient Nr.01 – het.c.3692A>C; p. Asn1231Thr

Blutungsanamnese:

Es wird von einer Hypermenorrhoe seit der Menarche berichtet. Eine Nachblutung nach einer Zahnoperation ist der Patientin erinnerlich. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor Aktivität und das Antigen liegen im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist dagegen mit 45% leicht verringert. Die Analyse der Multimere zeigt keine Auffälligkeiten. Jedoch ist die CBA mit 40% leicht erniedrigt. Es wird eine milde Form des vWS Typ 1 postuliert.

Tabelle 1: Darstellung der Laborbefunde (Patient 01).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	248 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	44%	42-141%
vWF: Akt.	43%	40-126%
Faktor VIII Akt.	45%	50-150%
vWF:CBA	40%	50-250%
Verschlusszeit Epi	180 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	202 s	68-121 s

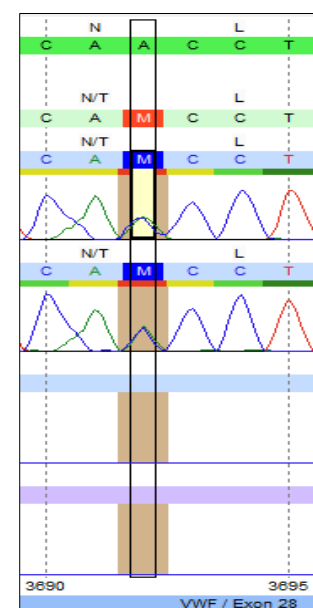


Abbildung 4:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.3692A>C
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab eine Punktmutation (c.3692A>C) im Exon 28 in heterozygoter Form. In Kombination mit einer zweiten

Veränderung (c.3686T>G) sind Daten in der Literatur vorhanden, die über eine mögliche klinische Relevanz bei Patienten mit von Willebrand Syndrom Typ 1 berichten (Kroner et al. 1991). Die Veränderung c.3692A>C allein ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Es kommt zu einem Austausch der Aminosäuren Asparagin und Threonin. Die betroffene Aminosäureposition 1231 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies hochkonserviert. Es zeigten sich nur geringe physikochemische Unterschiede zwischen den ausgetauschten Aminosäuren mit einer Grantham distance von 65. In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Die Pathogenitätsanalyse zeigte divergente Ergebnisse. Hierbei ergab die Analyse mit AGVGD einen Wert von C0 (nicht pathogen). Die SIFT Analyse zeigte einen Score von 0,54. Mutation Taster ergab „krankheitsverursachend“ mit einem p-Wert von 0,978. Polyphen 2 weist auf eine benigne Veränderung mit einem Score Wert von 0,02. Diese Ergebnisse deuten eher auf einen klinisch nicht relevanten Polymorphismus.

Tabelle 2: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für die Mutation c.3692A>C.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,54	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,978	pathogen
Polyphen 2	0,020	Nicht pathogen

Patient Nr.02 - het.c.2771G>A; p. Arg924Gln

Blutungsanamnese:

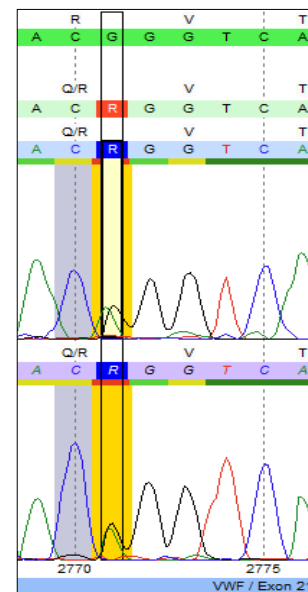
Die Patientin berichtet von einer Hämatomneigung bei Bagateltraumen. Eine ausgeprägte Nachblutungsneigung nach operativen Eingriffen (Tonsillektomie und Geburten) ist erinnerlich. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind bei der Patientin verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität liegen im unteren Normbereich. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Jedoch ist die CBA mit 34% erniedrigt. Es zeigt sich somit eine Konstellation wie bei einem vWS Typ 1.

Tabelle 3: Darstellung der Laborbefunde (Patient 02).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	235 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	47%	42-141%
vWF: Akt.	46%	40-126%
Faktor VIII Akt.	60%	50-150%
CBA	34%	50-250%
Verschlusszeit Epi	202 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	157 s	68-121 s



*Abbildung 5:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2771G>A
(Alamut visual)*

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des VWF-Gens ergab im Exon 21 die Mutation c.2771G>A in heterozygoter Ausprägung. Ursache auf DNA-Ebene ist hier ein Basenaustausch an Position 2771 von Guanin zu Adenin. Diese Variante ist als Mutation in der von Willebrand-Faktor Datenbank ISTH-SSC VWF Online Database bekannt und wiederholt beschrieben worden (Hilbert et al. 2003). Es besteht in heterozygoter Ausprägung eine Assoziation zu einem von Willebrand-Syndrom Typ 1. Die betroffene Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies nur mäßig konserviert. Es kommt zu einem Austausch von Arginin zu Glutamin mit nur geringen physikochemischen Unterschieden zwischen den ausgetauschten Aminosäuren (Grantham distance von 43). In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Die softwaregestützte Pathogenitätsanalyse weist auf eine benigne Veränderung hin. Die Analyse mit AGVGD zeigte einen Wert von C0 (nicht pathogen). Die SIFT Analyse zeigte einen Score von 0,17. Mutation Taster erbrachte das Ergebnis "polymorphism" mit einem p-Wert von 0,852. Polyphen 2 weist auf eine benigne Veränderung mit einem Score Wert von 0,008. Somit zeigt sich in der software gestützten Analyse kein pathogener Charakter der Mutation.

Tabelle 4: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für die Mutation c.2771 G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Patient Nr.03 – het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31

Blutungsanamnese:

Anamnestisch ist ein Antiphospholipidsyndrom bekannt. Eine Nachblutung bei Zahnextraktion ist der Patientin erinnerlich. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind diskret verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das Antigen liegen im Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist ebenso normwertig. Die Analyse der Multimere zeigt keine Auffälligkeiten. Jedoch ist die CBA mit 46% leicht erniedrigt. Ein vWS Typ 1 ist möglich.

Tabelle 5: Darstellung der Laborbefunde (Patient 03).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	263 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	103%	58,1-175,5%
vWF: Akt.	84%	58-176%
Faktor VIII Akt.	132%	50-150%
vWF: CBA	46%	50-250%
Verschlusszeit Epi	193 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	132 s	68-121 s

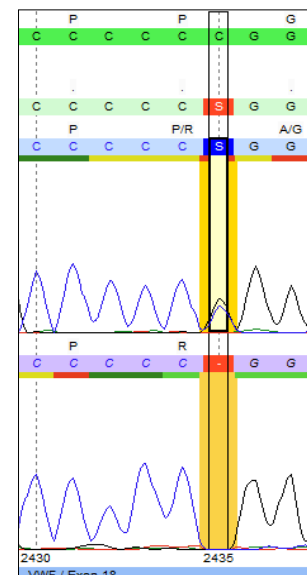


Abbildung 6:
Sequenzausschnitt der
Mutation c. 2435delC
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik ergab eine Deletion eines Basenpaares c.2435delC im Exon 18 des von Willebrand Faktor-Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einer Generierung eines vorzeitigen Stoppkodons 31 Basenpaare strangabwärts. Es entsteht ein sehr kurzes VWF-Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und intrazellulär abgebaut. Bei heterozygoter Ausprägung sorgt das intakte zweite Allel kompensatorisch für die Antigenkonzentration von 103%. Diese Variante ist als Mutation in der von Willebrand Faktor Datenbank bekannt und mit einem Typ 1 VWS assoziiert. In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Aufgrund des Kettenabbruchs war die Analyse der Proteinkonservierung und Pathogenität mit den Software Tools nicht möglich.

Patient Nr.04 - het.c.504insTATGACCCANGAAGG L168insX

Blutungsanamnese:

Die Tochter der Patientin hat ein gesichertes VWS Typ III.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das Antigen liegen im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist mit 64% normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Jedoch ist die CBA mit 51% im unteren Normbereich. Ein vWS Typ1 ist möglich.

Tabelle 6: Darstellung der Laborbefunde (Patient 04).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	262 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	64%	58,1-175,5%
vWF: Akt.	61%	58-176%
Faktor VIII Akt.	64%	50-150%
vWF: CBA	51%	50-250%
Verschlusszeit Epi	212 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	138 s	68-121 s

Molekulargenetische Diagnostik:

Es wurden aufgrund des bekannten Befundes der Tochter selektiv die Exons 4, 5 und 17 sequenziert. Es wurde eine Insertion/Duplikation von 15 Basen an Nukleotidposition 504 im Exon 5 in heterozygoter Ausprägung gefunden. Das führt zur Generierung eines Stoppkodons an Aminosäureposition 168 und damit zu einem stark verkürzten Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und intrazellulär abgebaut. Bei heterozygoter Ausprägung der Veränderung sorgt das intakte Allel für die Antigenkonzentration von 64%. Diese Variante ist bislang in der ISTH-SSC VWF Database nicht zu finden und auch in der Literatur nicht beschrieben. In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Eine Analyse der Proteinkonservierung oder Pathogenität ist auch aufgrund der Größe der Veränderung mit den benutzten Software Tools nicht möglich. Aufgrund der Größe der genetischen Veränderung wurde auf die Darstellung des Sequenzausschnittes verzichtet.

Patient Nr.05 – het.c.4042_4062dup; p.Lys1348_Val1354dup**Blutungsanamnese:**

Es wird eine Hypermenorrhoe berichtet. Zudem zeigte sich eine Nachblutung nach einer Zahnextraktion. Verlängerte Blutungen nach Schnittwunden sowie Blutungen der Mundschleimhaut berichtet die Patientin ebenfalls. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand-Faktor Aktivität und das Antigen sind erniedrigt. Die Faktor VIII-Aktivität ist dagegen mit 55% im unteren Normbereich. Die Multimeranalyse war unauffällig. Jedoch ist die CBA mit 38% erniedrigt. Es wird ein vWS Typ 1 angenommen. Die Bestimmung der Faktor XII Aktivität zeigt einen moderat erniedrigten Wert mit 34% (Normbereich 70-150%).

Tabelle 7: Darstellung der Ergebnisse (Patient 05).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	246 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	41%	42-141%
vWF: Akt.	17%	40-126%
Faktor VIII Akt.	55%	50-150%
vWF: CBA	38%	50-250%
Verschlusszeit Epi	>300 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	>300 s	68-121 s

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des Faktor XII-Gens ergab einen biologisch relevanten Polymorphismus 46T>C in heterozygoter Ausprägung im nicht kodierenden Bereich des Exon 1. In der Literatur wird dieser mit einer Verminderung von Faktor XII assoziiert (Hickson et al. 2010). Die Sequenzierung des von Willebrand-Faktor Gens ergab eine Insertion von 21 bp in Exon 28 in heterozygoter Ausprägung. Diese Variante ist bislang in der ISTH-SSC VWF Database nicht zu finden und auch in der Literatur nicht beschrieben. In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Eine Analyse der Proteinkonservierung oder Pathogenität ist auch aufgrund der Größe der Veränderung mit den üblichen Software Tools nicht möglich. Aufgrund der Größe der genetischen Veränderung wurde auf die Darstellung des Sequenzausschnittes verzichtet.

Patient Nr.06 - het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser

Blutungsanamnese:

Es sind erhebliche Nachblutungen nach einer Spontangeburt erinnerlich. Die Mutter der Patientin hat ein vWS Typ1.

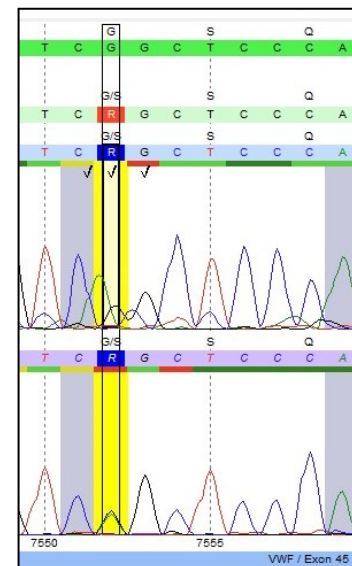
Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand-Faktor Aktivität und das Antigen sind erniedrigt. Die Faktor VIII-Aktivität ist mit 46% ebenfalls erniedrigt. Die

Multimeranalyse ist unauffällig. Komplettierend zeigt sich auch die CBA mit 42% vermindert. In Zusammenschau dieser Laborbefunde zeigt sich eine typische Konstellation eines von Willebrand-Syndroms Typ 1.

Tabelle 8: Darstellung der Laborbefunde (Patient 06).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	251 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	33%	42-141%
vWF: Akt.	27%	40-126%
Faktor VIII Akt.	46%	50-150%
vWF: CBA	42%	50-250%
Verschlusszeit Epi	224 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	129 s	68-121 s



*Abbildung 7:
Sequenzausschnitt der
Mutation *c.7552G>A*
(Alamut visual)*

Molekulargenetische Diagnostik:

Es erfolgte die selektive Sequenzierung von Exon 45 des von Willebrand-Faktor Gens einschließlich der Intron-/ Exon Übergänge aufgrund der bekannten Mutation der Mutter der Patientin. Die in der Familie bekannte Veränderung *c.7552G>A* wurde in heterozygoter Form gefunden. Diese Veränderung führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin durch Serin an der Position 2518. Diese Veränderung ist in der Literatur als Mutation beschrieben (Hilbert et al. 2003). Die Aminosäureposition 2518 ist unter Einbeziehung von 12 Spezies hochkonserviert. Die Aminosäuren Glycin und Serin besitzen nur geringe physikochemische Unterschiede. Die softwaregestützte Pathogenitätsanalyse ergab für Align GVGD eine C55. SIFT zeigte als Ergebnis "schädlich". Mutation Taster erbrachte das Ergebnis "krankheitsverursachend" und PolyPhen 2 einen Scorewert von 0,998 mit dem Ergebnis "wahrscheinlich pathogen". Eine klinische Signifikanz kann somit bestätigt werden. Die genetische Veränderung ist sehr wahrscheinlich für den Phänotyp verantwortlich.

Tabelle 9: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für Mutation c.7552G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C55	pathogen
SIFT	0	pathogen
Mutation Taster	P 1	pathogen
Polyphen 2	0,998	pathogen

Patient Nr.07 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys

Blutungsanamnese:

Die Großmutter und eine Tante der Patientin haben eine Blutungsneigung gehabt. Es ist jedoch keine Diagnostik erfolgt. Die Patientin berichtet von einer Neigung zu Zahnfleischbluten, Hämatomen und Blutungen nach Schnittwunden. Nachblutungen nach einer Zahnextraktion und eine Hypermenorrhoe sind erinnerlich.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeit für Epinephrin ist diskret verlängert. Die von Willebrand Faktor- Aktivität und das -Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität liegen im Referenzbereich. Die Multimeranalyse ergab einen unauffälligen Befund. Die CBA ist mit 60% im unteren Normbereich. Ein vWS Typ 1 kann bei diesen Befunden möglich sein (Bowman et al. 2013).

Molekulargenetische Diagnostik:

Es zeigt sich auf DNA-Ebene eine Änderung von Adenin zu Guanin an der Position 4751. Das führt zu einer Veränderung der Aminosäure Tyrosin zu Cystein an Position 1584. Diese Variante ist in der Literatur und in der vWD- Datenbank als eine so genannte „Founder Mutation“ bekannt und mit einem vWS Typ1 assoziiert (Bowman et al. 2013). Die Aminosäureposition 2518 ist unter Einbeziehung von 12 Spezies moderat konserviert. Die

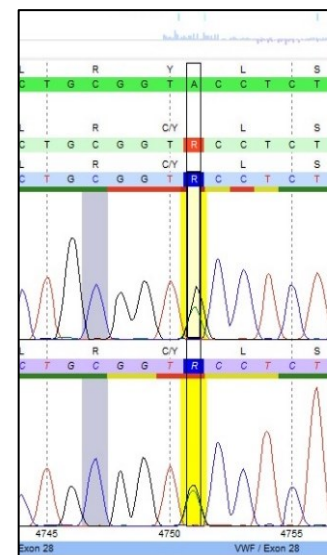


Abbildung 8:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.4751A>G
(Alamut visual)

ausgetauschten Aminosäuren zeigen große physikochemische Unterschiede bei einer Grantham distance von 194. In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. In der Pathogenitätsanalyse mit den Prediction tools gab es unterschiedliche Ergebnisse. AGVGD, SIFT und MutationTaster weisen auf nicht pathogene Veränderungen hin. PolyPhen2 zeigt als Ergebnis “möglicherweise schädigend”. Somit zeigt sich hier kein eindeutiger Pathogenitätsnachweis.

Tabelle 10: Darstellung der Laborbefunde (Patient 07).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	271 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	104%	42-141%
vWF: Akt.	87%	40-126%
Faktor VIII Akt.	91%	50-150%
vWF: CBA	60%	50-250%
Verschlusszeit Epi	179 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	105 s	68-121 s

Tabelle 11: Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.4751A>G.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,07	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 1	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,805	pathogen

Patient Nr.08 - het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31

Blutungsanamnese:

Nachblutungen nach Operationen sind dem Patienten bekannt. Der Patient berichtet von einer Neigung zu Hämatomen. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das Antigen sind leicht verringert bzw. im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist ebenfalls im unteren Normbereich. Die CBA ist verringert bei unauffälliger Multimerenanalyse. Es zeigt sich somit eine typische Konstellation eines vWS Typ1.

Tabelle 12: Darstellung der Laborbefunde (Patient 08).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	260 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vW Ag	34%	42-141%
vW Akt.	47%	40-126%
Faktor VIII Akt.	52%	50-150%
CBA	38%	50-250%
Verschlusszeit Epi	300 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	281 s	68-121 s

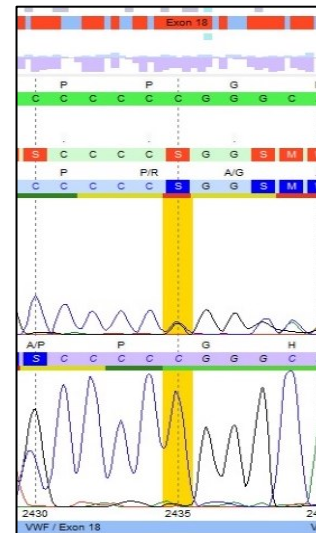


Abbildung 9:
Sequenzausschnitt der
Mutation *c.2435delC*
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik ergab eine Deletion eines Basenpaares c.2435delC im Exon 18 des von Willebrand Faktor-Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und zu einer Generierung eines vorzeitigen Stoppkodons 31 Basenpaare strangabwärts. Es entsteht ein sehr kurzes VWF-Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und intrazellulär abgebaut. Diese Variante ist als Mutation in der von Willebrand Faktor-Datenbank bekannt und mit einem vWS Typ 1 assoziiert (Hilbert et al. 2003). In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Aufgrund des Kettenabbruchs war die Analyse der Proteinkonservierung und Pathogenität mit den Software Tools nicht möglich.

Patient Nr.09 1. het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31 2. het.c.6554G>A; p.Arg2185Gln

Blutungsanamnese:

Bei einer Brustkorboperation im Alter von 15 Jahren war ein erniedrigter Quickwert auffällig. Es folgen mehrere Operationen bei Lymphangiom im linken Kieferwinkel ohne Blutungskomplikationen. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik: Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor- Aktivität und das -Antigen sind im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist nicht pathologisch verändert. Die CBA ist erniedrigt bei unauffälliger Multimeranalyse. Die Befunde können zu einem vWS Typ1 passen.

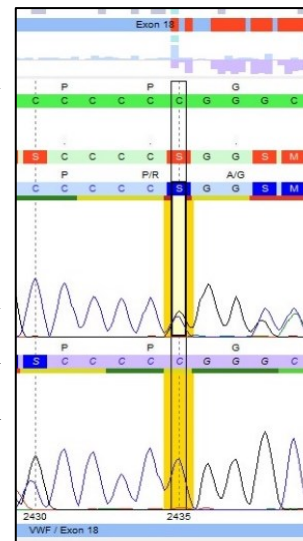


Abbildung 10:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2435delC
(Alamut visual)

Tabelle 13: Darstellung der Laborbefunde (Patient 09).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	134 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	52%	42-141%
vWF: Akt.	51%	40-126%
Faktor VIII Akt.	86%	50-150%
vWF: CBA	40%	50-250%
Verschlusszeit Epi	233 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	164 s	68-121 s

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik ergab die Deletion eines Basenpaares c.2435delC im Exon 18 des von Willebrand Faktor-Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und zu einer Generierung eines vorzeitigen Stoppkodons 31 Basenpaare strangabwärts. Es entsteht ein sehr kurzes VWF-Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und intrazellulär abgebaut. Diese Variante ist als Mutation

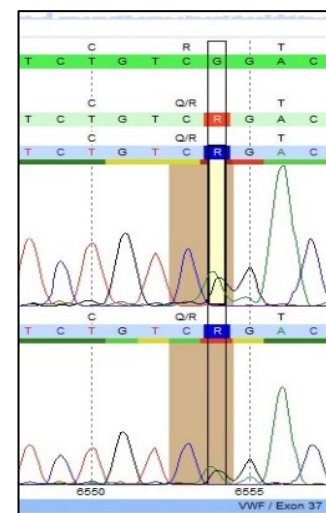


Abbildung 11:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.6554G>A
(Alamut visual)

in der von Willebrand Faktor-Datenbank bekannt und mit einem Typ 1 VWS assoziiert (Hilbert et al. 2003). In der MLPA Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Aufgrund des Kettenabbruchs war die Analyse der Proteinkonservierung und Pathogenität mit den üblichen Software-Tools nicht möglich. Eine zweite Veränderung c.6554G>A (p.Arg2185Gln) befindet sich im Exon 37 in Form eines heterozygoten Basenaustausches. Diese Variante ist Bestandteil der LOVD-vWF Datenbank mit dem Vermerk „wahrscheinlich nicht pathogen“ (Goodeve et al. 2007). Die betroffene Aminosäureposition 2185 ist unter Berücksichtigung von 10 Spezies hochkonserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren Arginin und Glutamin weisen nur geringe physikochemische Unterschiede auf bei einer Grantham Distance von 43. Die Pathogenitätsanalyse ergab für Align GVGD C0. SIFT zeigte „schädigend“ an. Mutation Taster bezeichnete die Veränderung als Polymorphismus. PolyPhen 2 wies auf eine mögliche klinische Signifikanz hin. Somit zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse.

Tabelle 14: Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Variante c.6554G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,04	pathogen
Mutation Taster	P 0	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,998	pathogen

Patient Nr.10 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln

Blutungsanamnese:

Der Patientin ist eine Hypermenorrhoe sowie Nachblutungen nach mehreren Eingriffen im HNO - und zahnärztlichen Bereich Erinnerung. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind diskret verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität sind erniedrigt. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 55% im unteren Normbereich. Es kann somit ein vWS Typ 1 angenommen werden.

Tabelle 15: Darstellung der Laborbefunde (Patient 10).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	156 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	28%	42-141%
vWF: Akt.	21%	40-126%
Faktor VIII Akt.	38%	50-150%
vWF: CBA	55%	50-250%
Verschlusszeit Epi	171 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	136 s	68-121 s

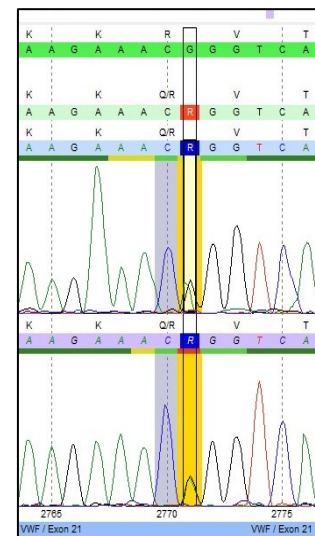


Abbildung 12:
Sequenzausschnitt der
Mutation *c.2771G>A*
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

Es ließ sich die Veränderung *c.2771G>A* im Exon 21 des vWF-Gens in heterozygoter Form nachweisen. Die Mutation führt zum Austausch der Aminosäuren Arginin und Glutamin an der Position 924. Diese hat vor allem bei Patienten mit Blutgruppe 0 einen modulierenden Einfluss. Sie ist in der Literatur bekannt und als Mutation mit einem milden vWS Typ 1 assoziiert (James et al. 2007). Die Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies moderat konserviert. Es zeigen sich nur geringe physikochemische Unterschiede zwischen beiden Aminosäuren mit einer Grantham Distance von 43. In der Pathogenitätsanalyse zeigte sich die Veränderung einheitlich klinisch nicht relevant.

Tabelle 16: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation *c.2771G>A*.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Patient Nr.11 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys

Blutungsanamnese:

Bei der Patientin liegt eine sekundäre funktionelle Sterilität vor. Während einer Schwangerschaft kam es dann zu einer missed Abortion und einem retroplazentaren Hämatom. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sowie Faktor VIII-Aktivität sind leicht erniedrigt. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist 28% verringert. Insgesamt besteht hier eine typische Konstellation im Sinne eines vWS Typ1.

Tabelle 17: Darstellung der Laborbefunde (Patient 11).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	245 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	<37%	42-141%
vWF: Akt.	35%	40-126%
Faktor VIII Akt.	48%	50-150%
vWF: CBA	28%	50-250%
Verschlusszeit Epi	>300 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	>300 s	68-121 s

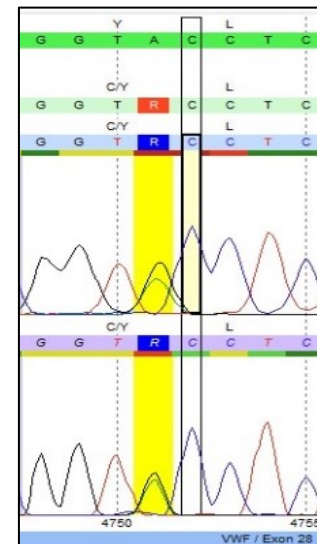


Abbildung 13:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.4751A>G
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

In der genetischen Diagnostik wurde die Veränderung c.4751A>G im Exon 28 des vWF-Gens in heterozygoter Ausprägung gefunden. Die Mutation führt zu einem Austausch von Tyrosin und Cystein an Position 1584. Es handelt sich um eine der „Founder Mutationen“ für das vWS Typ 1 (Bowman et al. 2013). Die Variante führt zu einer leichten vWF Reduktion. Die Position 1584 ist unter Einbeziehung von 12 Spezies moderat konserviert. Jedoch zeigen die

Aminosäuren Tyrosin und Cystein große physikochemische Unterschiede bei einem Grantham Distance von 194. In der Pathogenitätsanalyse ist eine mögliche klinische Relevanz beschrieben. AGVGD, SIFT und Mutation Taster weisen eher auf eine geringe klinische Signifikanz hin. PolyPhen2 weicht davon ab mit der Bewertung pathogen.

Tabelle 18: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.4751A>G.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,07	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 1	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,805	pathogen

Patient Nr.12 - het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31

Blutungsanamnese:

Während einer Schwangerschaft trat ein retrochoriales Hämatom auf. Darüber hinaus ist die Blutungsanamnese unauffällig. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind diskret verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sind im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist im Referenzbereich. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist normwertig. Die Befunde passen zu einem möglichen vWS Typ 1.

Tabelle 19: Darstellung der Laborbefunde (Patient 12).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	299 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	45%	42-141%
vWF: Akt.	55%	40-126%
Faktor VIII Akt.	69%	50-150%
vWF: CBA	73%	50-250%
Verschlusszeit Epi	175 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	143 s	68-121 s

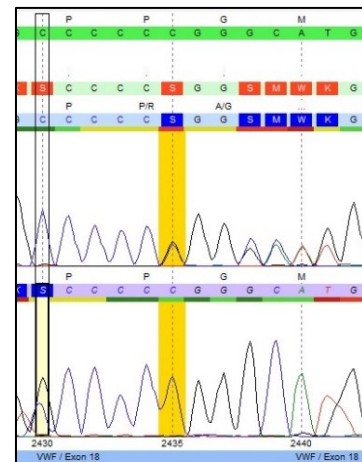


Abbildung 14:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2435delC
(Alamut visual)

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik ergab die Deletion eines Basenpaares c.2435delC im Exon 18 des von Willebrand Faktor-Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und somit zu einer Generierung eines vorzeitigen Stoppkodons 31 Basenpaare strangabwärts. Es entsteht ein sehr kurzes VWF Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und noch intrazellulär abgebaut. Diese Mutation ist in der von Willebrand Faktor-Datenbank bekannt und mit einem vWS Typ1 assoziiert (Hilbert et al. 2003). In der MLPA-Analyse konnten exonübergreifende Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen werden. Aufgrund des Kettenabbruches war die Analyse der Proteinkonservierung und Pathogenität mit den üblichen Software-Tools nicht möglich.

Patient Nr.13 1. het.c.3686T>G; p.Val1229Gly 2. het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr

Blutungsanamnese:

Anamnestisch zeigten sich bei der Patientin nach einer Zahnoperation im zweiten Lebensjahr und nach Operation einer Zyste im Kiefer starke Nachblutungen. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität sind moderat verringert. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 37% leicht verringert. Es zeigt sich eine typische Konstellation für ein vWS Typ1.

Tabelle 20: Darstellung der Laborbefunde (Patient 13).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	241 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	33%	42-141%
vWF: Akt.	32%	40-126%
Faktor VIII Akt.	48%	50-150%
vWF: CBA	37%	50-250%
Verschlusszeit Epi	274 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	130 s	68-121 s

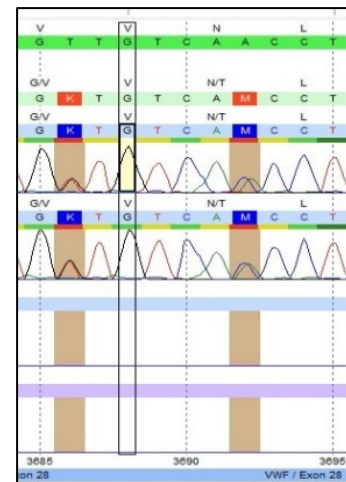


Abbildung 15:
Sequenzausschnitt der
Mutationen c.3686T>G
und c.3692A>C
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

In der genetischen Diagnostik konnten zwei Veränderungen (c.3686T>G; c.3692A>C) in jeweils heterozygoter Ausprägung gefunden werden. Diese führen zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Glycin an Position 1229 und von Asparagin zu Threonin an Position 1231. Die Aminosäureposition 1229 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies schwach konserviert. Zwischen Valin und Glycin gibt es moderate physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 109. Die Aminosäureposition 1231 ist dagegen hoch konserviert. Die Aminosäuren Asparagin und Threonin zeigen nur kleine physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 65. In der

Pathogenitätsanalyse zeigt sich keine klinische Relevanz. Beide Varianten sind bereits in der Literatur als Mutationen beschrieben und liegen zumeist auf einem Allel. Die Veränderungen wurden bei Patienten mit vWS Typ1, aber auch bei nicht betroffenen gesunden Personen nachgewiesen (Kroner et al. 1991; Eikenboom et al. 1998; Bellissimo et al. 2012).

Tabelle 21: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.3686T>G.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	1	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,807	Nicht pathogen
Polyphen 2	0	Nicht pathogen

Tabelle 22: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c. 3692A>C.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,54	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,978	pathogen
Polyphen 2	0,020	Nicht pathogen

Patient Nr.14 1. het.c.3686T>G; p.Val1229Gly 2. het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr

Blutungsanamnese:

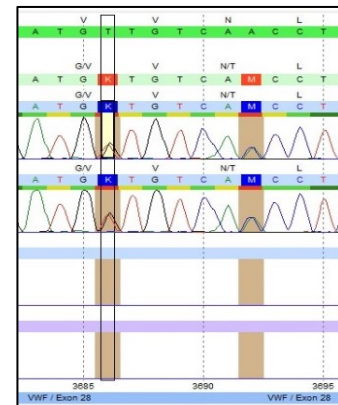
Die Patientin berichtet über rezidivierende Nachblutungen nach ärztlichen Eingriffen sowie Wundheilungsstörungen und transfusionspflichtigen Anämien. Die Tochter hat ein gesichertes vWS Typ1.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind diskret verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität sind moderat verringert. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 56% normwertig. Es zeigt sich somit bei dieser Patientin eine typische Konstellation für ein vWS Typ1.

Tabelle 23: Darstellung der Laborbefunde (Patient 14).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	143 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	27%	42-141%
vWF: Akt.	24%	40-126%
Faktor VIII Akt.	30%	50-150%
vWF: CBA	56%	50-250%
Verschlusszeit Epi	172 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	136 s	68-121 s



*Abbildung 16:
Sequenzausschnitt der
Mutationen c.3686T>G
und c. 3692A>C
(Alamut visual).*

Molekulargenetische Diagnostik:

In der genetischen Diagnostik zeigen sich identische Veränderungen wie bei der Tochter im vorherigen Fall. Es konnten zwei Veränderungen (c.3686T>G; c.3692A>C) in jeweils heterozygoter Ausprägung gefunden werden. Die Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse und der Proteinkonservierung decken sich.

Patient Nr.15 - het.c.7449C>G; p.Tyr2483*

Blutungsanamnese:

Bei primärer funktioneller Sterilität erfolgte die Vorstellung in der Fertilitätssprechstunde. Anamnestisch berichtet die Patientin von rezidivierender Epistaxis. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind verringert. Die Faktor VIII-Aktivität ist normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 52% im unteren Normbereich. Die Befunde sind mit einem vWS Typ1 vereinbar.

Tabelle 24: Darstellung der Laborbefunde (Patient 15).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	201 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	22%	42-141%
vWF: Akt.	20%	40-126%
Faktor VIII Akt.	109%	50-150%
vWF: CBA	52%	50-250%
Verschlusszeit Epi	289 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	187 s	68-121 s

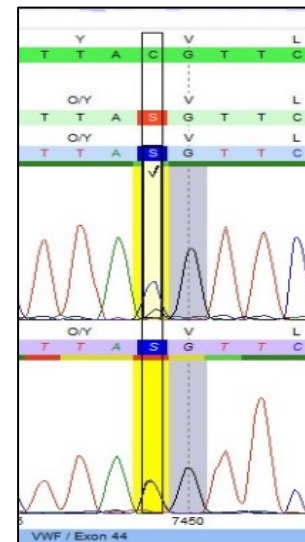


Abbildung 17:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.7449C>G
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik des vWF Gens zeigte eine Mutation c.7449C>G in heterozygoter Ausprägung in Exon 44. Die gefundene Veränderung ist bislang nicht in der Literatur beschrieben. Sie führt zu einem vorzeitigen Translationsabbruch an Position 2483. Es sind einige Nonsense- Mutationen an späteren Positionen beschrieben, die mit einem vWS assoziiert sind (p.Arg2535*, p.Gln2544*) (Eikenboom et al. 1998; O'Brien et al. 2003). Eine weiterführende Untersuchung bezüglich Pathogenität und Proteinkonservierung ist mit den Software-Tools nicht möglich.

Patient Nr.16 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von Zahnfleischbluten, Nachblutungen nach Operationen und einer Hämatomneigung. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind leicht verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität sind normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 82% normwertig. Die Befunde schließen ein vWS Typ1 nicht aus.

Tabelle 25: Darstellung der Laborbefunde (Patient 16).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	173 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	88%	42-141%
vWF: Akt.	85%	40-126%
Faktor VIII Akt.	95%	50-150%
vWF: CBA	82%	50-250%
Verschlusszeit Epi	180 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	132 s	68-121 s

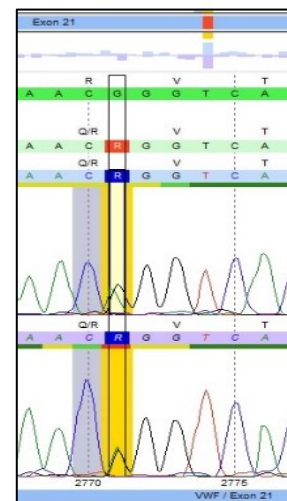


Abbildung 18:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2771G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab die Variante c.2771G>A im Exon 21 des Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 924. Diese hat vor allem bei Patienten mit Blutgruppe 0 einen modulierenden Einfluss. Sie ist in der Literatur als Mutation bekannt und mit einem milden vWS Typ 1 assoziiert (Hickson et al. 2010; James et al. 2007). Die Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies moderat konserviert. Es zeigen sich nur geringe physikochemische Unterschiede zwischen beiden Aminosäuren mit einer Grantham Distance von 42. In der Pathogenitätsanalyse zeigte sich die Veränderung klinisch eher nicht relevant.

Tabelle 26: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.2771G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Patient Nr.17 - het.c.6187C>T; p.Pro2063Ser

Blutungsanamnese:

Anamnestisch sind drei Aborte bekannt. Der Bruder der Patientin hat rezidivierende Epistaxis.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist leicht verringert. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 55% ebenso im unteren Normbereich. Diese Werte können zu einem vWS Typ1 passen.

Tabelle 27: Darstellung der Laborbefunde (Patient 17).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	334 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	45%	42-141%
vWF: Akt.	42%	40-126%
Faktor VIII Akt.	40%	50-150%
vWF: CBA	55%	50-250%
Verschlusszeit Epi	230 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	137 s	68-121 s

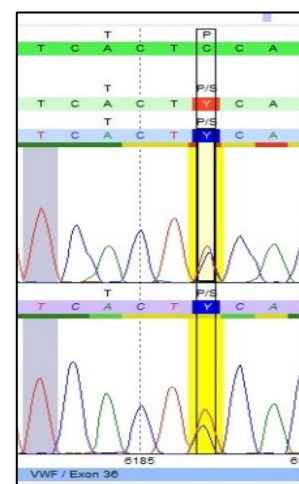


Abbildung 19:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.6187C>T
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik zeigt die Variante c.6187C>T im Exon 36 des vWF-Gens in heterozygoter Ausprägung. Es kommt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin an Position 2063. Diese Veränderung ist in der Literatur als Mutation bekannt und mit einem vWS Typ 1 und Typ 3 assoziiert (Goodeve et al. 2007). Auch bei nicht betroffenen Personen wurde diese Veränderung gefunden. Die betroffene Position ist unter Berücksichtigung von 10 Spezies hochkonserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren weisen moderate physikochemische Unterschiede auf bei einer Grantham Distance von 74. In der Pathogenitätsanalyse wird einheitlich eine deutliche klinische Relevanz beschrieben.

Tabelle 28: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.6187C>T.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C65	pathogen
SIFT	0	pathogen
Mutation Taster	P 1	pathogen
Polyphen 2	0,999	pathogen

Patient Nr.18 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln

Blutungsanamnese:

Bei der Patientin ist ein hereditärer Faktor XII-Mangel nachgewiesen (Restaktivität 34%). Die Patientin zeigt klinisch eine Hypermenorrhoe. Familiär ist eine Kugelzellanämie bekannt.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind normwertig. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind genauso wie die Faktor VIII-Aktivität normal. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 98% normwertig. Diese Ergebnisse weisen nicht auf ein vWS hin.

Tabelle 29: Darstellung der Laborbefunde (Patient 18).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	283 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	127%	42-141%
vWF: Akt.	143%	40-126%
Faktor VIII Akt.	106%	50-150%
vWF: CBA	98%	50-250%
Verschlusszeit Epi	134 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	82 s	68-121 s

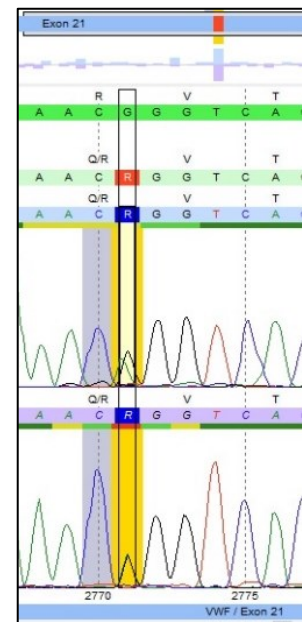


Abbildung 20:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2771G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Bei der Patientin ist ein hereditärer Faktor XII-Mangel bekannt. In der Sequenzierung des Faktor XII-Gens zeigten sich zwei Veränderungen het.c.-4T>C; het.c.440A>T in jeweils heterozygoter Ausprägung. Die erste Variante hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz und wurde als Polymorphismus deklariert. Die zweite Variante führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Isoleucin an Position 147 (p.Asn147Ile).

Die Sequenzanalyse des vWF Gens zeigt die Variante c.2771G>A im Exon 21 des Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 924. Diese hat vor allem bei Patienten mit Blutgruppe 0 einen modulierenden Einfluss. Sie ist in der Literatur als Mutation bekannt und mit einem milden vWS Typ 1 assoziiert (James et al. 2007). Die Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies moderat konserviert. Es zeigen sich nur geringe physikochemische Unterschiede zwischen beiden Aminosäuren bei einer Grantham Distance von 42. In der Pathogenitätsanalyse zeigte sich die Veränderung klinisch nicht relevant.

Tabelle 30: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c. 2771G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Patient Nr.19 - het.c.2771G>A; p.Arg924Gln

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von einer deutlichen Blutungsneigung vor allem nach Operationen (Hüfte, Auge) sowie Wundheilungsstörungen. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeit für Epinephrin ist verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind nicht erniedrigt. Die Faktor VIII-Aktivität ist normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 143% ebenso normwertig. Diese Befunde geben keinen eindeutigen Hinweis für ein vWS.

Tabelle 31: Darstellung der Laborbefunde (Patient 19).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	222 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	175%	42-141%
vWF: Akt.	139%	40-126%
Faktor VIII Akt.	124%	50-150%
vWF: CBA	143%	50-250%
Verschlusszeit Epi	215 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	108 s	68-121 s

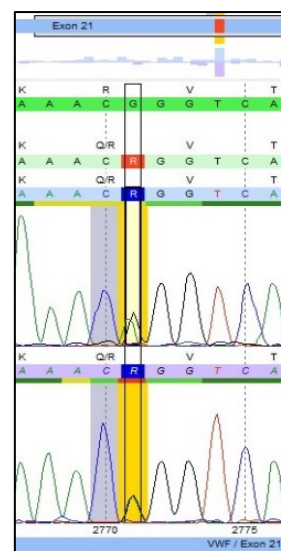


Abbildung 21
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2771G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzanalyse des vWF-Gens zeigt die Variante c.2771G>A im Exon 21 des Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 924. Diese hat vor allem bei Patienten mit Blutgruppe 0 einen modulierenden Einfluss. Sie ist in der Literatur als Mutation bekannt und mit einem milden vWS Typ 1 assoziiert (James et al. 2007). Die Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies moderat konserviert. Es zeigen sich nur geringe physikochemische Unterschiede zwischen beiden Aminosäuren bei einem Grantham Distance von 42. In der Pathogenitätsanalyse zeigte sich die Veränderung klinisch nicht relevant.

Tabelle 32: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.2771G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Patient Nr.20 - het.c.1728G>T; p.Met576Ile

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von Blutungen nach Zahnextraktionen, einer Hypermenorrhoe und einer Nachblutung nach Thyreoidektomie. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Das von Willebrand Faktor-Antigen ist deutlich vermindert bei noch normwertiger Aktivität. Die Faktor VIII-Aktivität ist leicht verringert. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 57% im unteren Normbereich. Diese Befunde können zu einem vWS Typ 1 passen.

Tabelle 33: Darstellung der Laborbefunde (Patient 20).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	283 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	19%	42-141%
vWF: Akt.	41%	40-126%
Faktor VIII Akt.	41%	50-150%
vWF: CBA	57%	50-250%
Verschlusszeit Epi	280 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	170 s	68-121 s

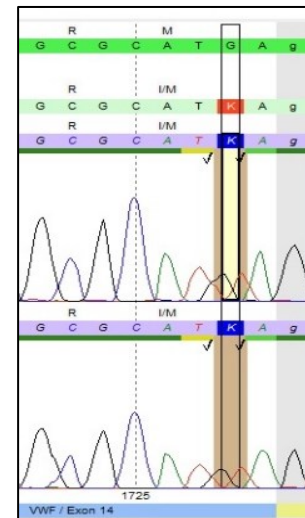


Abbildung 22:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2771G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Analyse des vWF-Gens ergab die Variante c.1728G>T im Exon 14 in heterozygoter Ausprägung. Es zeigt sich ein Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin an Position 576. Diese Veränderung ist in der Literatur als Mutation beschrieben und mit einem vWS Typ1 assoziiert (James et al. 2007). Die betroffene Aminosäureposition ist unter Berücksichtigung von zehn Spezies schwach konserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren zeigen nur geringe physikochemische Unterschiede mit einem Grantham Distance von 10. Die Pathogenitätsanalyse zeigt keine klinische Relevanz.

Tabelle 34: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.1728G>T.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,35	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 1	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,002	Nicht pathogen

Patient Nr.21 - het.c.6221_6224dupCCAA; p.Lys2075ASnfs*16

Blutungsanamnese:

Die Patientin beschreibt eine Neigung zu Hämatomen und Blutungen nach Schnittverletzungen, außerdem hatte sie in der Jugend häufig Epistaxis. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeit für Epinephrin ist deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor - Aktivität und das -Antigen sind in unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 69% normal. Die Befunde können zu einem vWS Typ 1 passen.

Tabelle 35: Darstellung der Laborbefunde (Patient 21).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	216 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	53%	42-141%
vWF: Akt.	61%	40-126%
Faktor VIII Akt.	78%	50-150%
vWF: CBA	69%	50-250%
Verschlusszeit Epi	>300 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	143 s	68-121 s

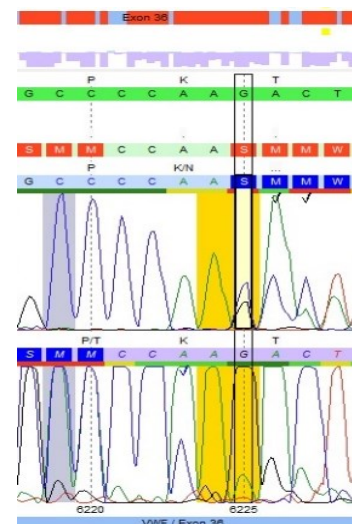


Abbildung 23:
Sequenzausschnitt der
Variante
c.6221_6224dupCCAA
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die genetische Diagnostik ergab eine Insertion c.6221_6224dupCCAA in Exon 36 in heterozygoter Aussprägung. Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und Generierung eines vorzeitigen Stoppkodons an Aminosäureposition 2090. Die Veränderung ist bislang in keiner Datenbank oder der Literatur bekannt. Eine Analyse der Proteinkonservierung oder Pathogenität war mit den Software-Tools nicht möglich.

Patient Nr.22 - het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von rezidivierendem Zahnfleischbluten sowie Nachblutungen nach Operationen. Die Familienanamnese ist leer.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeit für Epinephrin ist deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor - Aktivität und das -Antigen sind im unteren Normbereich. Die Faktor VIII-Aktivität ist normwertig. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 60% normal. Die Befunde können zu einem vWS Typ1 passen.

Tabelle 36: Darstellung der Laborbefunde (Patient 22).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	253 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	54%	42-141%
vWF: Akt.	53%	40-126%
Faktor VIII Akt.	83%	50-150%
vWF: CBA	60%	50-250%
Verschlusszeit Epi	294 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	114 s	68-121 s

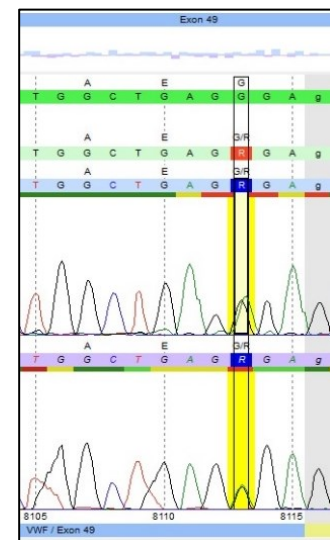


Abbildung 24:

Sequenzausschnitt der
Mutation c.8113G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab die Variante c.8113G>A in heterozygoter Ausprägung im Exon 49. Diese Veränderung ist nicht in den Datenbanken bekannt, jedoch in der Literatur als Mutation beschrieben und mit einem vWS Typ1 assoziiert (Mazurier 1992). Es kommt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin an Position 2705. Diese Position ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies hochkonserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren zeigen moderate physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 125. Die Pathogenitätsanalyse weist bei uneinheitlichen Befunden eher auf eine klinische Relevanz hin. Die Analyse mit Mutation Taster bewertet die Veränderung abweichend als Polymorphismus.

Tabelle 37: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.8113G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C65	pathogen
SIFT	0	pathogen
Mutation Taster	P 0	Nicht pathogen
Polyphen 2	1	pathogen

Patient Nr.23 1. het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31 2. het.c.2561G>A; p.Arg854Gln

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von rezidivierendem Zahnfleischbluten sowie Nachblutungen nach Zahnoperationen. Es bestand eine Hypermenorrhoe.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind normwertig. Die Faktor VIII-Aktivität ist verringert. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 63% ebenfalls normwertig. Die Befunde können zu einem vWS Typ1 passen.

Tabelle 38: Darstellung der Laborbefunde (Patient 23).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	320 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	74%	42-141%
vWF: Akt.	58%	40-126%
Faktor VIII Akt.	29%	50-150%
vWF: CBA	63%	50-250%
Verschlusszeit Epi	228 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	152 s	68-121 s

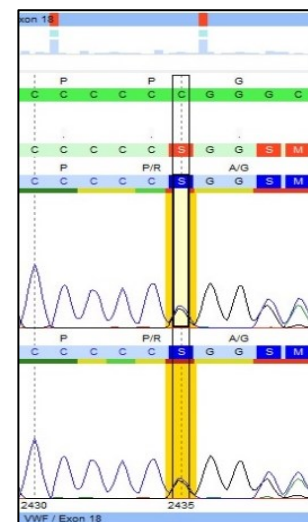


Abbildung 25:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.2561G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab in Exon 18 die Variante c.2435delC (p.Pro812Argfs*31) sowie im Exon 20 die Variante c.2561G>A (p.Arg854Gln) in jeweils heterozygoter Ausprägung. Beide Mutationen sind in der ISTH-SSC VWF Online Database bekannt und liegen auf einem Allel. Sie sind als Mutation beschrieben und mit einem vWS Typ 1 assoziiert (Hilbert et al. 2003).

Die Nukleotiddeletion (c.2435delC) im Exon 18 des vWF Gens führt zu einer Leserasterverschiebung und zu einem vorzeitigen Stoppkodon an der Position 842 im Exon 19 und somit zu einem verkürzten Protein. Dieses wird wahrscheinlich als Defektprotein erkannt und noch intrazellulär eliminiert. Aufgrund des Kettenabbruchs war eine Analyse der Proteinkonservierung oder Pathogenität mit den Software-Tools nicht möglich.

Die zweite Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 854 von Arginin zu Glutamin. Diese Position ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies hochkonserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren zeigen geringe physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 43. Die Pathogenitätsanalyse weist auf eine deutliche klinische Relevanz hin.

Tabelle 39: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.2561G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C35	pathogen
SIFT	0	pathogen
Mutation Taster	P 1	pathogen
Polyphen 2	0,994	pathogen

Patient Nr.24 - het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys

Blutungsanamnese:

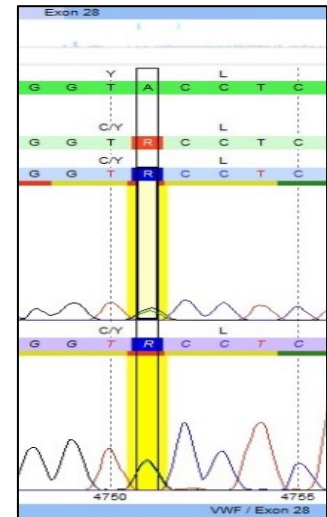
Der Patientin ist eine Hypermenorrhoe und Nachblutung nach Tonsillektomie bekannt. Die Mutter zeigt eine Neigung zu Hämatomen. Eine Diagnostik blieb bei ihr ohne pathologischen Befund.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität sind im unteren Normbereich. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 37% leicht verringert. Die Befunde passen zu einem vWS Typ 1.

Tabelle 40: Darstellung der Laborbefunde (Patient 24).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	295 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	53%	42-141%
vWF: Akt.	54%	40-126%
Faktor VIII Akt.	55%	50-150%
vWF: CBA	37%	50-250%
Verschlusszeit Epi	235 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	162 s	68-121 s



*Abbildung 26:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.4751A>G
(Alamut visual).*

Molekulargenetische Diagnostik:

In der genetischen Diagnostik wurde die Veränderung c.4751A>G im Exon 28 des vWF-Gens in heterozygoter Ausprägung gefunden. Die Mutation führt zu einem Austausch von Tyrosin zu Cystein an Position 1584. Es handelt sich um eine der „Founder Mutationen“ für das vWS Typ 1 (Hilbert et al. 2003). Die Variante führt zu einer leichten vWF Reduktion. Die Position 1584 ist unter Einbeziehung von 12 Spezies moderat konserviert. Jedoch zeigen die Aminosäuren Tyrosin und Cystein große physikochemische Unterschiede bei einer Grantham Distance von 194. In der Pathogenitätsanalyse ist mit Polyphen 2 eine mögliche klinische Relevanz beschrieben. Die übrigen Tools zeigen ein gegenteiliges Ergebnis.

Tabelle 41: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.4751A>G.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	0	Nicht pathogen
SIFT	0,07	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 1	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,805	pathogen

Patient Nr.25 - het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser

Blutungsanamnese:

Die Tochter der Patientin hat ein gesichertes vWS Typ1. Vor der Menopause ist eine Hypermenorrhoe erinnerlich.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das - Antigen sowie die Faktor VIII-Aktivität liegen an der unteren Grenze des Normbereichs. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 31% leicht verringert. Es zeigen sich typische Befunde wie bei einem vWS Typ1

Tabelle 42: Darstellung der Laborbefunde (Patient 25).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	285 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	41%	42-141%
vWF: Akt.	41%	40-126%
Faktor VIII Akt.	51%	50-150%
vWF: CBA	31%	50-250%
Verschlusszeit Epi	267 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	160 s	68-121 s

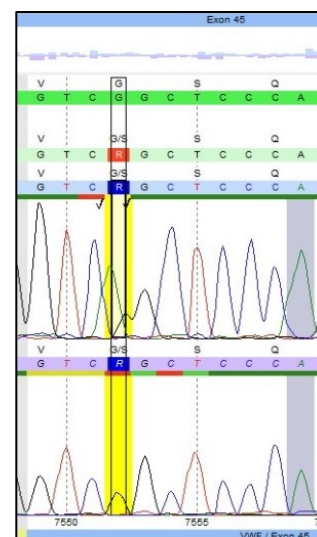


Abbildung 27:

Sequenzausschnitt der Mutation c. 7552G>A (Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab die Variante c.7552G>A (p.Gly2518Ser) im Exon 45 in heterozygoter Ausprägung. Diese Veränderung ist Bestandteil der ISTH-SSC VWF Online Database und wird in der Literatur als Mutation beschrieben sowie mit einem vWS Typ 1 assoziiert (Eikenboom et al. 1993).

Die Mutation führt zu einem Aminosäuretausch von Glycin zu Serin an Position 2518. Diese Position ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies hochkonserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren zeigen geringe physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 53. Die Pathogenitätsanalyse zeigte eine deutliche klinische Relevanz. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die genetische Veränderung verantwortlich für den Phänotyp.

Tabelle 43: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.7552G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C55	pathogen
SIFT	0	pathogen
Mutation Taster	P 1	pathogen
Polyphen 2	0,998	pathogen

Patient Nr.26 - het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg

Blutungsanamnese:

Die Patientin berichtet von einer Hypermenorrhoe sowie einer Nachblutung nach einer Zahnoperation. Die Familienanamnese ist positiv beim Großvater, Vater und dem Bruder. Diese zeigen typische Blutungssymptome vom mukokutanen Typ. Eine Diagnostik wurde bislang nicht durchgeführt.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind deutlich verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind deutlich verringert. Die Faktor VIII-Aktivität liegt im unteren Normbereich. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 18% ebenfalls verringert. Die Befunde passen gut zu einem vWS Typ1.

Tabelle 44: Darstellung der Laborbefunde (Patient 26).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	223 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	0	
vWF: Ag	18%	42-141%
vWF: Akt.	18%	40-126%
Faktor VIII Akt.	63%	50-150%
vWF: CBA	18%	50-250%
Verschlusszeit Epi	>300 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	>300 s	68-121 s

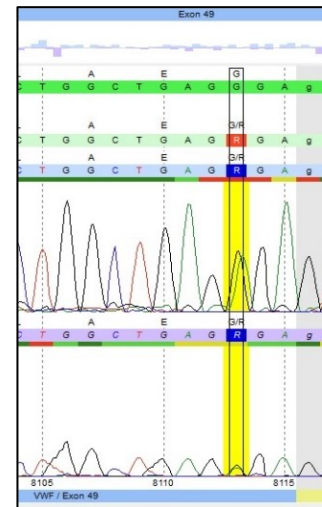


Abbildung 28:
Sequenzausschnitt der
Mutation c.8113G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab in Exon 49 die heterozygote Variante c.8113G>A (p.Gly2705Arg). Diese ist nicht Bestandteil der Datenbanken. In der Literatur ist sie jedoch als Mutation beschrieben und assoziiert mit einem vWS Typ1 (Mazurier 1992). Es kommt durch die Mutation zu einem Aminosäuretausch an Position 2705 von Glycin zu Arginin. Diese Position ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies hochkonserviert. Die getauschten Aminosäuren zeigen moderate physikochemische Unterschiede mit einer Grantham Distance von 125. Die Pathogenitätsanalyse zeigte eine klinische Relevanz.

Tabelle 45: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.8113G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C65	Pathogen
SIFT	0	Pathogen
Mutation Taster	P 0	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,999	Pathogen

Patient Nr.27 - het.2771G>A; p.Arg924Gln

Blutungsanamnese:

Eine Hypermenorrhoe ist bekannt. Familiär und auch bei der Patientin Ist ein Faktor XII-Mangel bekannt.

Labordiagnostik:

Die Verschlusszeiten sind nicht verlängert. Die von Willebrand Faktor-Aktivität und das -Antigen sind diskret verringert. Die Faktor VIII-Aktivität ist erniedrigt. Die Multimeranalyse ist unauffällig. Die CBA ist mit 73% normwertig. Die Laborbefunde passen bei nicht verlängerter Verschlusszeit nicht sicher zu einem vWS Typ1.

Tabelle 46: Darstellung der Laborbefunde (Patient 27).

Laborparameter	Messwert	Referenzbereich
Thrombozyten	197 Gpt/l	140-450 Gpt/l
Blutgruppe	Nicht 0	
vWF: Ag	39%	42-141%
vWF: Akt.	39%	40-126%
Faktor VIII Akt.	42%	50-150%
vWF: CBA	73%	50-250%
Verschlusszeit Epi	142 s	84-160 s
Verschlusszeit ADP	82 s	68-121 s

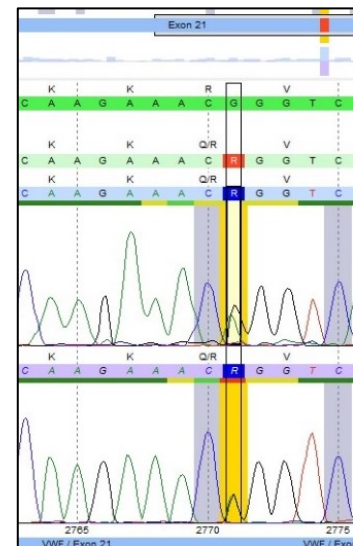


Abbildung 29:
Sequenzausschnitt der
Mutation c2771G>A
(Alamut visual).

Molekulargenetische Diagnostik:

Die Sequenzierung des vWF-Gens ergab die Mutation c.2771G>A im Exon21 des Gens in heterozygoter Ausprägung. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 924. Diese hat vor allem bei Patienten mit Blutgruppe 0 einen modulierenden Einfluss. Sie ist in der Literatur als Mutation beschrieben und mit einem milden vWS Typ 1 assoziiert (James et al. 2007). Die Aminosäureposition 924 ist unter Berücksichtigung von 12 Spezies moderat konserviert. Es zeigen sich nur geringe

physikochemische Unterschiede zwischen beiden Aminosäuren. In der Pathogenitätsanalyse zeigte sich die Veränderung klinisch nicht relevant.

Tabelle 47: Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse der Mutation c.2771G>A.

Software	Resultat	Bewertung
AGVGD	C0	Nicht pathogen
SIFT	0,17	Nicht pathogen
Mutation Taster	P 0,852	Nicht pathogen
Polyphen 2	0,008	Nicht pathogen

Zusammenfassend lag bei 25 Patienten eine auffällige Blutungsanamnese vor. Vor allem die Hypermenorrhoe mit folgender Anämie oder Nachblutungen nach Zahnextraktionen sowie Aborte und Wundheilungsstörungen nach Operationen waren typische Angaben. Im Labor zeigte sich zunächst bei fast allen Patienten eine verlängerte Verschlusszeit. Die vWF Aktivität und Antigenkonzentration waren bei 22 Patienten erniedrigt beziehungsweise im unteren Normbereich. In allen Fällen wurde auch die Faktor VIII Aktivität bestimmt. Die Multimeranalyse war in allen Fällen unauffällig, so dass ein vWS Typ 2 ausgeschlossen wurde. Zur weiteren Beurteilung wurde bei allen Patienten die Thrombozytenzahl, CrP und die Blutgruppe bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt eine zusammenfassende Darstellung über Geschlecht und Alter der 27 Patienten sowie die nachgewiesenen Mutationen.

Tabelle 48: Zusammenfassende Darstellung der Patienten anhand von Geschlecht, Alter sowie der gefundenen genetischen Varianten und der betroffenen Exons.

Rot markierte Mutationen konnten im Schrifttum nicht nachgewiesen werden.

Patient	Geschlecht	Alter	Mutation	Exon
1	weiblich	14	het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr	28
2	weiblich	45	het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	21
3	weiblich	35	c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	18
4	weiblich	55	het.c.504insTATGACCCANGAAGG; L168insX	5
5	weiblich	69	c.4042_4062dup; p.Lys1348_Val1354dup	28
6	weiblich	43	het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser	45
7	weiblich	60	het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	28
8	männlich	51	het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	18
9	männlich	18	het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	18
			het.c.6554G>A; p.Arg2185Gln	37
10	weiblich	42	het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	21
11	weiblich	38	het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	28
12	weiblich	28	het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	18
13	weiblich	22	het.c.3686T>G; p.Val1229Gly	28
			het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr	28
14	weiblich	44	het.c.3686T>G; p.Val1229Gly	28
			het.c.3692A>C; p.Asn1231Thr	28

15	weiblich	32	het.c.7449C>G; p.Tyr2483*	44
16	weiblich	70	het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	21
17	weiblich	29	het.c.6187C>T; p.Pro2063Ser	36
18	weiblich	31	het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	21
19	weiblich	67	het.c.2771G>A; p.Arg924Gln	21
20	weiblich	48	het.c.1728G>T; p.Met576Ile	14
21	weiblich	35	het.c.6221_6224dupCCAA; p.Lys2075ASnfs*16	36
22	weiblich	38	het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg	49
23	weiblich	56	het.c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	18
			het.c.2561G>A; p.Arg854Gln	20
24	weiblich	44	het.c.4751A>G; p.Tyr1584Cys	28
25	weiblich	61	het.c.7552G>A; p.Gly2518Ser	45
26	weiblich	67	het.c.8113G>A; p.Gly2705Arg	49
27	weiblich	29	het.2771G>A; p.Arg924Gln	21

Es fanden sich bei den 27 Patienten dieser Arbeit 15 verschiedene Mutationen. Vier dieser Mutationen sind bislang nicht publiziert. In drei Fällen zeigten sich zwei heterozygote Mutationen. Die verbleibenden 25 Patienten wiesen einfach heterozygote Veränderungen auf. Es fanden sich 20 von insgesamt 31 Mutationen (64%) und somit eine Häufung in den Exons 18, 21 und 28 (siehe Tabelle 48).

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Das von Willebrand Syndrom ist die häufigste angeborene Gerinnungsstörung und zeigt eine Prävalenz von bis zu 1% in der Gesamtbevölkerung (Rodeghiero et al. 1987). Im Vergleich hierzu zeigt die Hämophilie A/B eine Inzidenz von 1:10.000 männlichen Personen (Konkle et al. 1993). Der hereditäre Faktor VII-Mangel zeigt sich bei 1:500.000 Menschen (Lapecorella und Mariani 2008). Der vererbte Faktor XII-Mangel ist noch einmal deutlich seltener mit 1:1.000.000 (Renné et al. 2005).

Die Vererbung des vWS erfolgt autosomal. Somit könnte man eine Gleichverteilung der Geschlechter annehmen. Jedoch zeigt sich eine Häufung bei Frauen aufgrund von geschlechtsspezifischen Blutungssymptomen wie zum Beispiel der Hypermenorrhoe. (Leebeek und Eikenboom 2017) Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine deutliche Häufung beim weiblichen Geschlecht (25 Frauen und 2 Männer) mit überwiegend geschlechtsspezifischen Blutungssymptomen.

Es gibt klare diagnostische Pfade für den Nachweis eines vWS Typ 2 und 3. Schwierigkeiten gibt es dagegen beim deutlich häufigeren vWS Typ1. Definitionsgemäß liegt hier ein partieller Mangel des vWF vor. Es existieren jedoch keine klaren Grenzwerte, die für die Diagnosestellung herangezogen werden können (James und Lillicrap 2013; Nichols et al. 2008). Der Normbereich für den vWF liegt zwischen 50 und 150 UI/ dl (Sadler et al. 2006). Ein vWS Typ 3 liegt bei einem (sub)totalen Mangel an vWF vor (Lavin et al. 2017). Somit ergibt sich eine Spanne von der unteren Normwertgrenze abwärts für das vWS Typ1 (Lavin et al. 2017). In der Literatur wird ein „diagnostischer“ Graubereich bei Werten zwischen 30 und 50 UI /dl diskutiert (Lavin et al. 2017; Sadler et al. 2006) . Diese Patienten werden als „mögliches vWS Typ1“ klassifiziert (Leebeek und Eikenboom 2017. Bei Werten unter 30 UI/dl ist ein vWS Typ1 wahrscheinlich (Lavin et al. 2017; Sadler et al. 2006). Für die Diagnosestellung ist weiterhin der klinische Phänotyp von Bedeutung. Es zeigen sich sowohl Patienten mit vWF-Befunden unter 30UI/dl ohne relevante Blutungssymptome, als auch Patienten mit Werten im Graubereich oder im unteren Normbereich mit typischen Blutungssymptomen (Lavin et al. 2017). Somit variiert die Penetranz zum Teil erheblich.

Patienten, die den Phänotyp eines vWS Typ 1 aufweisen, zeigen ein sehr heterogenes Spektrum an Mutationen. Das zeigt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit (siehe Abbildung 30). Diese werden in der Regel autosomal dominant vererbt und sind über das gesamte Gen verteilt. Es handelt sich in der Regel um heterozygote Veränderungen auf einem Allel. Das nicht betroffene Allel ist für die vWF-Restkonzentration verantwortlich. Es zeigen sich jedoch auch gemischt heterozygote Situationen, deren klinische Signifikanz nicht immer eindeutig ist (Zhang et al. 1997; James und Lillicrap 2012). Auch im Rahmen dieser Arbeit gibt es Fälle mit zwei (gemischt) heterozygoten Mutationen. Über die Allelverhältnisse

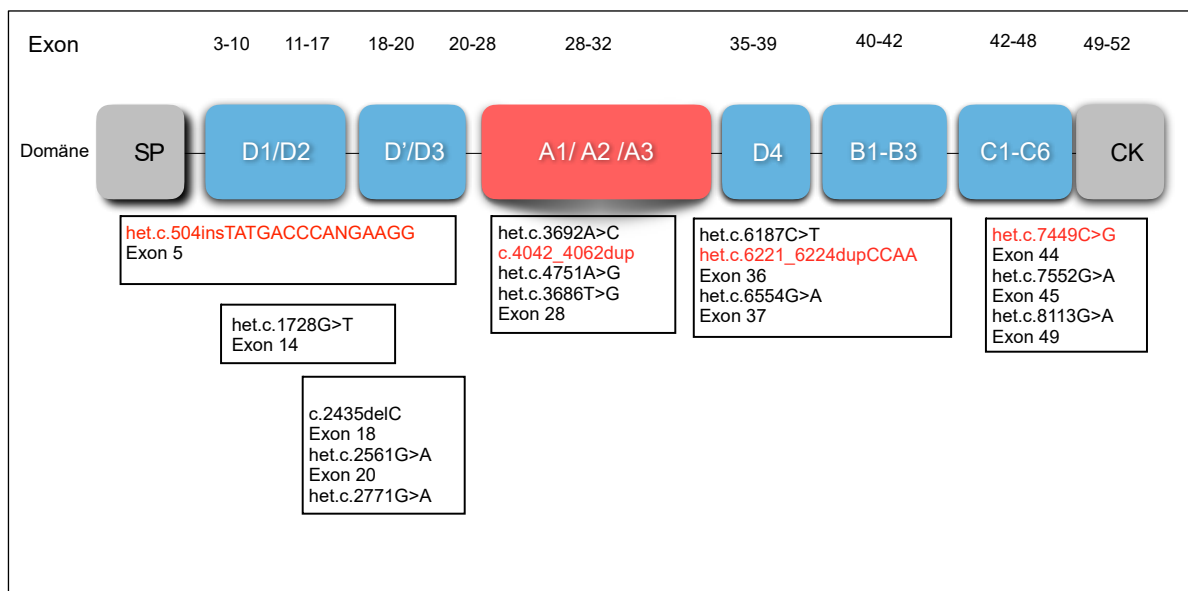


Abbildung 30: Zuordnung der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Mutationen zu den Exons. Neue Mutationen sind rot markiert.

konnten jedoch ohne Familienuntersuchungen keine Aussagen gemacht werden. Wie schon im Ergebnisteil beschrieben wurde, zeigt sich bei den Patienten dieser Studie eine Häufung der Mutationen in den Exons 18, 21 und 28 (64% aller Mutationen in dieser Arbeit). Dies wird in der Literatur nicht beschrieben. Jedoch handelt es sich bei dieser Arbeit um eine regionale Studie in Nordostdeutschland. Weitere Untersuchungen an größeren Kohorten zur Bestätigung dieser Aussage sind notwendig.

Die Daten der vier großen internationalen vWS Studien legen nahe, dass genetische Varianten außerhalb des vWF-Gens auch in Kombination mit vWF-Mutationen für verringerte vWF-Konzentrationen verantwortlich sind (Goodeve et al. 2007; Cumming et al. 2006; James und

Lillicrap 2012). Solche Veränderungen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wurden die Exons und die Intron-/Exon-Übergänge des vWF-Gens sequenziert.

Es gibt zahlreiche Einflussfaktoren, welche die vWF-Konzentration verändern. Zum Beispiel sind bei erhöhten Spiegeln von Östrogenen oder bei Hyperthyreose die vWF-Konzentrationen erhöht (Liu et al. 1993). Bei Vorliegen einer Akute-Phase-Reaktion sind die Konzentrationen auch erhöht (Pottinger et al. 1989). Somit können grenzwertig pathologische Befunde maskiert werden. Mehrfachuntersuchungen können dieses Risiko reduzieren. Mit steigendem Lebensalter steigt die vWF-Konzentration um 1 bis 2% pro Lebensjahr an (Conlan et al. 1993; Coppola et al. 2003). Zudem haben Patienten mit Blutgruppe 0 vWF-Konzentrationen, welche 25% niedriger sind als bei Patienten, welche nicht Blutgruppe 0 haben (Gill et al. 1987; Mezzano und Quiroga 2019).

Veränderungen an der Basenabfolge der DNA können vielgestaltig sein. Es werden verschiedene Mutationstypen unterschieden. Zunächst gibt es Punktmutationen. Hier ist eine einzelne Base verändert. Eine Substitution bedeutet ein Austausch einer Base gegen eine andere Base. Es entstehen Missense-Mutationen, wenn hierdurch für eine abweichende Aminosäure kodiert wird. Es entsteht eine Nonsense-Mutation, wenn hierdurch ein Stoppkodon entsteht. Wenn sich durch Insertion oder Deletion einzelner Basen das nachfolgende Leseraster verschiebt, spricht man von Punktmutation. Es können jedoch auch größere Abschnitte eines Exons oder ganzer Gene durch Insertionen und Deletionen betroffen sein. Auch die Verdopplung oder Duplikation kann kurze Abschnitte oder einzelne oder auch mehrere Gene betreffen (Jong und Eikenboom 2017).

In einem Review von de Jong und Eikenboom aus 2017 wurden alle bis dato bekannten vWS Typ 1 Mutationen systematisch aufgearbeitet. Es wurden über 250 verschiedene Mutationen gefunden. Grundlage hierfür waren die großen vWS-Studien aus dem Vereinigten Königreich, Europa und Kanada in den Jahren zwischen 2000 und 2010. In mehr als 70% der Fälle handelt es sich um Missense-Mutationen. Es zeigten sich deutlich seltener kleine Deletionen oder Insertionen sowie Splice Site-bzw. Nonsense-Mutationen (Jong und Eikenboom 2017). In 15% der Fälle zeigten sich mehrere Veränderungen gleichzeitig (James und Lillicrap 2012). Dieser Trend ist auch in den Ergebnissen dieser Arbeit zu sehen (Tabelle 49).

Tabelle 49: Nachgewiesene Mutationen der vorliegenden Arbeit, sortiert nach Missense-/Nonsense-Mutation sowie Insertion/Deletion und Duplikation. Neue Mutationen sind rot markiert.

Missense Mutation durch Substitution	Nonsense Mutation durch Substitution	Insertion/ Deletion	Duplikation
het.c.3692A>C p.Asn1231Thr	het.c.7449C>G p.Tyr2483*	het.c.504insTATGACCCANGAAGG L168insX	c.4042_4062dup p.Lys1348_Val1354dup
het.c.2771G>A p.Arg924Gln		c.2435delC; p.Pro812Argfs*31	het.c.6221_6224dupCCAA p.Lys2075ASnfs*16
het.c.7552G>A p.Gly2518Ser			
het.c.4751A>G p.Tyr1584Cys			
het.c.6554G>A p.Arg2185Gln			
het.c.3686T>G p.Val1229Gly			
het.c.6187C>T p.Pro2063Ser			
het.c.1728G>T p.Met576Ile			
het.c.8113G>A p.Gly2705Arg			
het.c.2561G>A p.Arg854Gln			

Jedoch konnte durch James et al auch gezeigt werden, dass unter den Indexpatienten mit niedrigeren vWF-Konzentrationen (<30UI/dL) häufiger vWF-Mutationen gefunden wurden (James und Lillicrap 2013). Diese Fragestellung zur Sensitivität kann im Rahmen dieser

Arbeit nicht beantwortet werden, da alle Patienten Mutationen aufwiesen. Es wird aber die Notwendigkeit zur Deklaration von Grenzwerten des vWF-Phänotyps betont.

Das vWS Typ 1 wird in vielen Fällen autosomal dominant vererbt. Es gab jedoch Untersuchungen an niederländischen Familien die eine autosomal-rezessive Vererbung vermuten lassen. Unterschiedliche Allelverhältnisse wurden beschrieben. Es zeigten sich Familienmitglieder mit einfachen heterozygoten Mutationen (z.B. Null-Allel) und normwertigen vWF:Ag-Konzentrationen ohne Blutungssymptome. Andere Familienmitglieder mit gemischt-heterozygoten Mutationen (zwei betroffene Allele) zeigten dagegen verringerte vWF:Ag-Konzentrationen und Blutungssymptome. Hier zeigte sich eindeutig eine Weitergabe von je einer Mutation von jedem Elternteil auf das Kind. Die Eltern zeigten mit je einer einfachen heterozygoten Veränderung keine Blutungssymptome. Mit vier untersuchten Familien war jedoch keine große Fallzahl vorhanden. Jedoch wird verdeutlicht, wie wichtig Familienuntersuchungen für die Einordnung von genetischen Varianten und deren Allelverhältnissen sind (Eikenboom et al. 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten sich durchweg heterozygote Veränderungen. Mehrfachmutationen traten bei vier Patienten auf. In zwei der Fälle handelte es sich dabei um Mutter und Tochter. Beide zeigen die identischen Veränderungen auf einem Allel mit vollständiger Penetranz. Beide zeigen eine typische Blutungsanamnese und verringerte vWF:Ag Konzentrationen. In den beiden anderen Fällen konnten aufgrund fehlender Angaben zu vertikalen Familienuntersuchungen keine Angaben zur Allelverteilung gemacht werden. Auch hier zeigt sich eine typische Blutungsanamnese bei vWF:Ag-Konzentrationen im unteren Normbereich.

Der direkte Pathomechanismus ist in vielen Fällen ungeklärt. Häufig zeigt sich eine verringerte vWF-Produktion. Heterozygote Mutationen, welche zu einer Leserasterverschiebung führen sind für sogenannte Null-Allele verantwortlich. Das nicht mutierte Allel gewährt eine residuale vWF-Synthese. Diese ist jedoch um 50% herabgesetzt. Es resultiert eine vWF:Ag Konzentration von 25-100% (normal 50%-200%). Durch ein heterozygoten Null-Allel können also Patienten mit einem vWS Typ1 kaschiert werden, wenn sie keine Blutungssymptome aufweisen (Jong und Eikenboom 2017).

Ein weiterer Pathomechanismus ist eine Verminderung der Sekretion. In vitro-Untersuchungen zeigten eine Retention von mutiertem vWF im Golgi-Apparat und

Endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Die Proteasomen scheinen hier eine Schlüsselrolle zu haben (Bodó et al. 2001).

Die Halbwertszeit des vWF beträgt 8-12 Stunden. Eine erhöhte Clearance wird auch als mögliches Korrelat für ein klinisches vWS Typ1 (Typ1c) diskutiert (James und Lillicrap 2013; Swystun und Lillicrap 2018). Mutationen, welche ein Clearance-Defekt hervorrufen, betreffen vornehmlich die D3-Domäne.

Der Prototyp dieses Pathomechanismus stellt der vWS Typ 1 Vicenza dar. Hier kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 1205 (Schneppenheim et al. 2000; Haberichter et al. 2008). Typisch ist die erhöhte vWFpp/vWF:Ag-Ratio und die ausgeprägte, aber zu kurze Desmopressin-Antwort (Mannucci 1998; Castaman et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit ist das Propeptid nicht bestimmt worden, so dass Aussagen zu Clearance und Halbwertszeit des vWF und somit ein mögliches vWS Typ 1c nicht möglich sind. Ursprünglich wurde die Erkrankung anhand einer Familie auf den finnischen Åland-Inseln beschrieben (Nilsson 1999). Die Häufigkeit der genetischen Veränderungen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen wurde bereits untersucht. Bei gesunden Afroamerikanern wurden bei 60% genetische Varianten im vWF-Gen gefunden. Diese Individuen waren asymptomatisch. Die gleichen Veränderungen wurden zuvor im Rahmen anderer Studien als mögliche vWS-Mutationen bewertet. Das Potential von genetischen Veränderungen mit Bezug zur Pathogenität ist weiterhin eine Herausforderung (Bellissimo et al. 2012). Laufende Studien wie zum Beispiel das 1000 Genom Projekt können möglicherweise zur Klärung dieser Frage beitragen (James und Lillicrap 2012).

Die Ergebnisse von Genom-weiten Studien untermauern den Einfluss der ABO Blutgruppen-Gene auf die vWF-Konzentration. Jedoch verdichten sich Hinweise auf weitere modulierende genetische Loci außerhalb des vWF-Gens, welche die Biosynthese, intrazellulären Transport/Sekretion und Clearance des vWF empfindlich beeinflussen und somit für den Phänotyp eines vWS Typ1 verantwortlich sein können. Beschrieben sind hier Loci, welche für Proteine der Exozytose sowie für Rezeptorproteine kodieren (Swystun und Lillicrap 2018; Sabater-Lleal et al. 2019). Dabei scheinen seltene genetische Varianten an diesen Loci ein höheres pathogenetisches Potential zu haben (Smith et al. 2010). Weitere Studien sind hier notwendig, um den Einfluss der genetischen Loci auf die vWF-Konzentration verständlich zu

machen. Zusammengefasst verdichtet sich die Auffassung eines Modells des vWS Typ 1 als komplexe, multigenetische Erkrankung variabler Penetranz.

Software-Tools unterstützen bei der Bewertung von genetischen Varianten. Aspekte der Aminosäurekonservierung im Laufe der Evolution von Spezies, sowie physikochemische Unterschiede zwischen ausgetauschten Aminosäuren werden so analysiert und interpretiert. Für kurze Mutationen, die lediglich ein Nucleotid bzw. eine Aminosäure betreffen sind diese Instrumente adäquat. Für größere Veränderungen sind sie nicht konzipiert. Durch die Vernetzung mit Datenbanken und das ständige Aktualisieren und Präzisieren dieser Software Tools erhofft man sich eine Verbesserung in der Interpretation von genetischen Varianten auch im klinischen Kontext.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier dieser Programme benutzt. In den meisten Fällen zeigten sich konkordante Ergebnisse. Problematisch wird die Bewertung bei diskordanten Ergebnissen. Zudem tragen sie nicht zur Klärung von Pathomechanismen bei bislang unbekannten genetischen Varianten bei. Insgesamt war die Bewertung durch die Software-Tools jedoch hilfreich.

Prinzipiell sind genetische Untersuchungen zur Beantwortung einer gezielten Fragestellung als ergänzende Diagnostik sinnvoll. Klinische Verdachtsdiagnosen können so bestätigt werden. Auch ist eine Diagnosestellung auf der Grundlage des Nachweises von Mutationen möglich (James et al. 2008). Jedoch zeigt sich ein Trend in Richtung der Hochdurchsatzverfahren wie zum Beispiel Next Generation Sequencing (NGS) oder Gen Panel Sequenzierung (Simeoni et al. 2016). Im Rahmen von Forschungsprojekten sind solche Verfahren hilfreich und effektiv. Es werden schnell sehr große Datenmengen generiert. Die Bewertung dieser Datenmengen stellt jedoch eine Herausforderung dar. Im klinischen Alltag ist die Sequenzierung von einzelnen Genen oder sogar Exons oft ausreichend. Darüber hinaus ist der Umgang mit zufällig gefundenen genetischen Varianten oder Mutationen jenseits der eigentlichen klinischen Fragestellung im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren problematisch und sollte kritisch bewertet werden.

Eine klinische Stufendiagnostik ist für viele Krankheitsbilder etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das ebenfalls veranschaulicht werden. Es zeigt sich eine Häufung von Mutationen in den Exons 18, 21 und 28 des vWF-Gens (Abbildung 31 und 32). Hier waren 20

von insgesamt 31 Mutationen in dieser Arbeit zu finden. Somit ist die Frage nach einer molekulargenetischen Stufendiagnostik für das vWS Typ1 berechtigt. Ein Screening in Form der Sequenzierung der am häufigsten betroffenen Exons erscheint denkbar. Erst bei positivem Screeningtest folgt die Sequenzierung des gesamten vWF-Gens. Die Daten für diese Überlegungen stammen aus der Region Nordostdeutschland. Die Population ist mit 27 Patienten klein. Es sind Untersuchungen an deutlich größeren Kohorten notwendig um die Bedeutung und die diagnostische Sicherheit einer molekulargenetischen Stufendiagnostik für das vWS Typ1 zu bewerten.

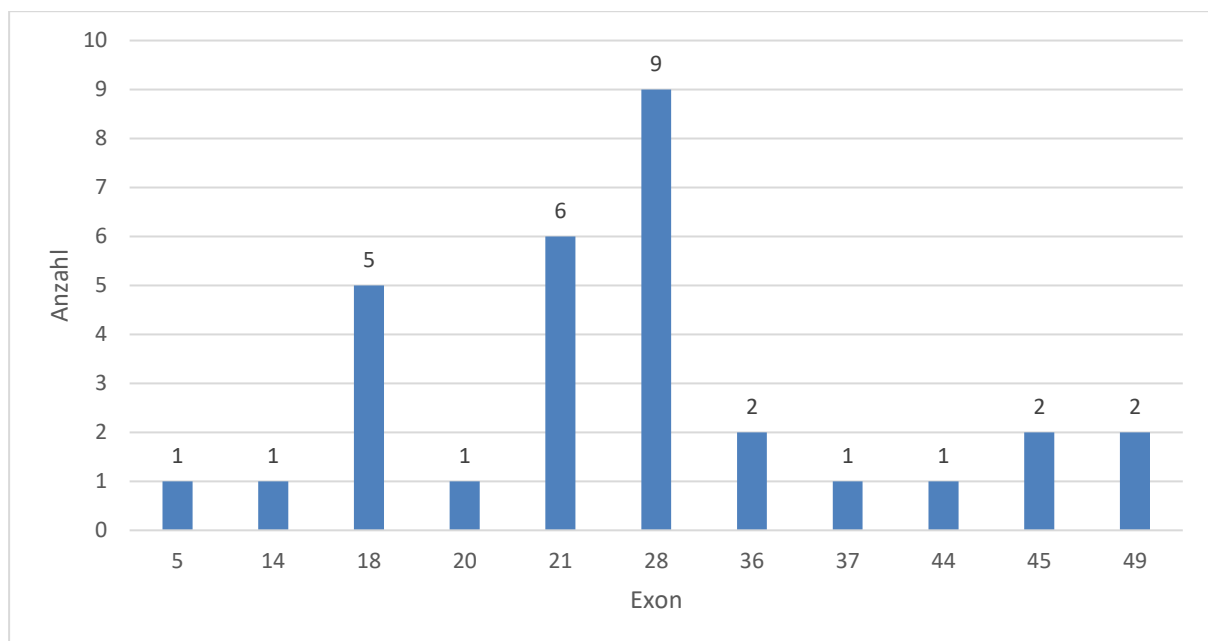


Abbildung 31: Darstellung der kumulativen Anzahl von Mutationen (mit Mehrfachnennungen einzelner Mutationen) und den jeweiligen betroffenen Exons des vWF-Gens. Eine Häufung in den Exons 18, 21 und 28 ist ersichtlich.

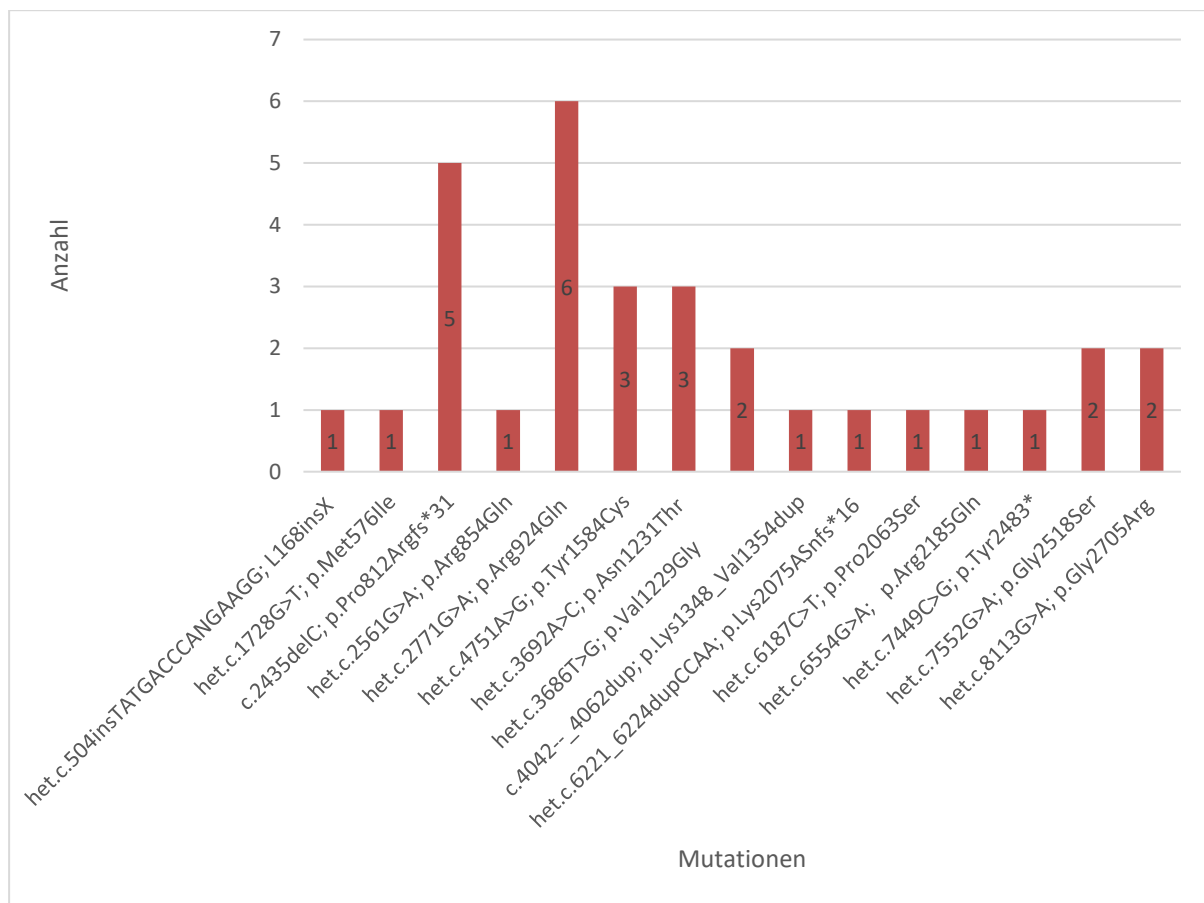


Abbildung 32: Darstellung der insgesamt 15 verschiedenen Mutationen und ihrer Häufigkeiten in der vorliegenden Arbeit.

4.2 Fallbezogene Diskussion

Patient 01 (p.Asn1231Thr)

Es zeigt sich eine typische Blutungsanamnese bei leerer Familienanamnese. Das Gerinnungslabor (vWF:Ag und Akt., CBA und Verschlusszeit) passt zu einem vWS Typ1. Die Multimeranalyse ist unauffällig und somit ein vWS Typ 2 unwahrscheinlich. Es erfolgte die Sequenzierung der 52 Exons und der Intron-/ Exon Übergänge. Es konnten mehrere klinisch nicht relevante Polymorphismen gefunden werden. Zudem zeigte sich eine Missense Mutation mit bislang unbekannter Signifikanz in Exon 28.

Bellissimo et al. berichteten in ihrer amerikanischen Studie an gesunden Probanden von dieser Mutation. In dieser Studie wurde Asn1231Thr nur in Kombination mit Val1229Gly bei gesunden Afro-Amerikanern in drei Fällen gefunden. Die vWF-Konzentration war >140 UI/dl. Dies unterstützt die Hypothese, dass diese Veränderungen benigne sind. Es sind jedoch

weitere Untersuchungen an gesunden Probanden aus der Bevölkerung notwendig um den Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen des VWF -Gens und deren Pathogenität, auch unter dem Aspekt verschiedener ethnischer Gruppen besser zu charakterisieren. (Bellissimo et al. 2012) Bei Patient 01 lag die Mutation allein vor.

James et al. führten eine kanadische Studie durch. Die Mutation Asn1231Thr wurde in drei Fällen gefunden, jedoch auch hier nur in Kombination mit der Mutation Val1229Gly. Die Analyse mit SIFT und PolyPhen weist auf neutrale Veränderungen hin.(James et al. 2007)

Die in unserem Fall gefundene Mutation wurde alleinstehend in der Literatur bislang noch nicht berichtet. Die Signifikanz kann nicht abschliessend bewertet werden. Die Pathogenitätsanalyse mit den Prediction Tools lässt die Annahme zu, dass es sich um eine benigne Veränderung ohne klinische Relevanz handelt. Die klinische Symptomatik und die Ergebnisse im Gerinnungslabor in diesem Fall lassen die Diagnose eines vWF Typ 1 zu. Es wären weitere Untersuchungen, vorzugsweise auch an nicht betroffenen Familienmitgliedern sinnvoll, um weitere Erkenntnisse über die Signifikanz der Mutation zu erhalten.

Patient 02 (p.Arg924Gln)

In diesem Fall passt der Phänotyp gut zu einem vWS Typ 1. Die Sequenzierung der 52 Exons zeigte die Mutation 2771G>A in heterozygoter Ausprägung. Diese Veränderung wurde in der Literatur wiederholt beschrieben und führt zum Aminosäureaustausch an Position 924.

Die amerikanische Studie von Bellissimo et al. zeigte diese Mutation in vier Fällen (gesunde Probanden) mit einer Häufigkeit von 2,1% in dieser Gruppe. Die Laborwerte lagen im Normbereich (vWF:Ag; vWF:RCO; FVIII; vWFpp; vWF:CB) und die Probanden hatten keine Blutungssymptome. (Bellissimo et al. 2012) Nach unserer Analyse ist die Aminosäureposition 924 nur mäßig konserviert. Die Pathogenitätsanalyse weist eher auf eine neutrale Veränderung im Sinne eines Polymorphismus hin. Dieser Sachverhalt wird durch diese Studie bestätigt, wenn auch die Fallzahl mit vier Fällen auf 184 Probanden niedrig erscheint. Die Häufigkeit von 2,1 % entspricht nicht der Definition einer Mutation.

Hilbert et al. berichten von zwei neuen Mutationen in sieben französischen Familien. Die c.3159G>T und c.3178T>C befinden sich in der D3 - Domäne des vWF. Es wird eine verringerte FVIII - Bindungskapazität beschrieben. Bei einem der Probanden wurde zusätzlich zur c.3178T>C die c.2771G>A in heterozygoter Ausprägung gefunden. Um die Frage zu klären, ob diese Mutation (Arg924Gln) einen Einfluss auf die FVIII-Bindung hat, wurde der mutierte und der Wildtyp rvWF und seine FVIII -Bindung verglichen. Es zeigte

sich kein Unterschied. Auch die Ergebnisse aus dieser Studie weisen auf einen Polymorphismus ohne Effekt auf die Funktion des Proteins hin. (Hilbert et al. 2003)

Goodeve et al. führten die europäische vWD Typ 1 Studie durch. Aus 14 europäischen Zentren konnten 150 Indexpatienten mit bereits diagnostiziertem vWS Typ1 eingeschlossen werden. Die Mutation c.2771G>A fand sich in einem Fall in Kombination mit der Mutation c.3944G>T und bei einem Indexpatienten als alleinige Mutation. Bei beiden Patienten bestand klinisch ein vWS Typ1. (Goodeve et al. 2007)

Hickson et al führten 2010 eine Studie auf der Basis der MCMDM-1 VWD Studie durch. Studien in Kanada, EU und dem Vereinigten Königreich zum vWS Typ1 fanden ein paar wenige Sequenzvariationen, die sich in allen 3 Studien wiederholten. Hierzu gehört auch die c.2771G>A mit p.Arg924Glu. Es erfolgte die Untersuchung von 148 Indexpatienten mit einem vWS Typ1 sowie ihrer betroffenen und nicht betroffenen Familienmitglieder auf diese Mutation. Darüber hinaus wurden 1115 gesunde Probanden untersucht. Die Mutation wurde in vier der 148 Familien gefunden. Der Genotyp war heterozygot. Eine mögliche Verbindung zwischen der Mutation und verringerter vWF- und FVIII-Konzentration und Aktivität wurde vermutet, jedoch ist die Stärke des Einflusses dieser Mutation unklar. Unter den gesunden Probanden zeigte sich die Mutation in 1,6% der Fälle (bei den Indexfällen 2%). Es gab hier also keinen signifikanten Unterschied. Untersuchungen an unterschiedlichen ethnischen Gruppen weisen auf einen Ursprung in Ost Europa hin. Eine Wildtyp- und Mutanten-Sequenz (rekombinanter vWF) wurde einer Expressionsanalyse zugeführt. Weder die Expression noch die Sekretion oder Clearance zeigten signifikante Unterschiede. Es wird vermutet, dass eine weitere Sequenz-Variante mit einer Verbindung zu der diskutierten Mutation c.2771G>A als Ursache für die erniedrigten Spiegel von vWF:Ag und FVIII:C in Betracht zu ziehen sind. (Hickson et al. 2010)

Zusammenfassend kann dieser Mutation keine eindeutige klinische Relevanz zugesprochen werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig.

Patient 03 (p.Pro812Argfs*31)

In diesem Fall besteht eine typische Blutungsanamnese, jedoch zeigt sich anamnestisch ein Antiphospholipidsyndrom bei leerer Familienanamnese. Trotz Mehrfachbestimmung weisen die Laborergebnisse nicht eindeutig auf ein vWS Typ 1 hin. Lediglich die Verschlusszeit und die CBA sind pathologisch verändert. Aufgrund des Kettenabbruches auf Aminosäure Ebene war eine Pathogenitätsanalyse nicht möglich. Es wird durch das betroffene Allel ein stark

verkürztes Protein synthetisiert. Dieses wird wahrscheinlich noch intrazellulär eliminiert. Das gesunde Allel sorgt für einen ausreichend hohen Antigenspiegel. In der Literatur und den Datenbanken ist die Mutation bekannt.

Goodeve et al. veröffentlichten Ergebnisse der europäischen MCMDM-1VWD Studie. In einem Fall zeigte sich auch die Pro812Argfs*31 Mutation. Ob und wie die Mutation Einfluss auf das vWF-Protein hat, wird in dieser Studie nicht erläutert. (Goodeve et al. 2007)

In einer ungarischen Studie von Mohl et al. werden 23 von insgesamt 24 bekannten ungarischen Familien mit einem vWS Typ3 molekulargenetisch untersucht. Es wurden 15 neue Mutationen gefunden. Auch sechs bekannte Mutationen wurden erkannt. Hierzu zählte auch die Pro812Argfs*31. Sie trat nicht allein auf. In fünf Fällen ergab sich eine gemischt - heterozygote Situation und in einem Fall sogar eine homozygote. Die Allelfrequenz beträgt 12,5% in der ungarischen Kohorte mit vWS Typ3. Die Autoren sehen Hinweise für einen Ursprung dieser Mutation im osteuropäischen Baltikum. Es gibt Grund zur Annahme, dass diese Mutation mit der Bevölkerungsbewegung über Europa bis in den Mittelmeerraum getragen wurde (Mohl et al. 2011).

Baronciani et al. untersuchten 40 Patienten mit einem vWS Typ3 mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft (12 Italiener, 14 Iraner, 14 Inder). Es wurden 45 neue Mutationen gefunden sowie fünf bekannte Mutationen, darunter auch in einem Fall die Pro812Argfs*31 in heterozygoter Ausprägung. Das Resultat ist ein verkürztes Protein. (Baronciani et al. 2003)

Jokela et al. untersuchten in einer finnischen Studie 10 Patienten mit einem vWS Typ3. In Finnland sind insgesamt 27 Patienten mit einem vWS Typ3 bekannt. Somit enthielt diese Studie 40% der finnischen vWS Typ 3 Patienten. Die Deletion c.2435delC wurde in neun von 20 Allelen gefunden. Vier Patienten waren homozygot und ein Patient gemischt heterozygot. Pro812Argfs*31 zusammen mit Arg1659Val waren in 85% der Allele der zehn Patienten vorhanden. Im Rahmen der genetischen Diagnostik erfolgte zunächst ein Screening auf c.2435delC. Bei einem heterozygoten oder negativen Ergebnis wurde das gesamte Gen sequenziert. C.2435delC ist eine von den zwei häufigsten Mutationen bei finnischen vWS Typ3 Patienten. Es wird eine Leserasterverschiebung und ein Aminosäurekettenabbruch hervorgerufen. Der Ursprung dieser Mutation liegt im Ostseeraum. Auch die von E. A. von Willebrand untersuchte Familie auf den Åland-Inseln hatte diese Mutation. Ein gemeinsamer Ursprung ist anzunehmen. (Jokela et al. 2013)

In unserer Arbeit zeigt sich die Mutation c.2435delC in fünf Fällen in heterozygoter Ausprägung. Klinisch zeigt sich jeweils ein vWS Typ1. In der Literatur zeigt sich jedoch eindeutig eine Assoziation zu einem vWS Typ3 und vor allem in der finnischen Studie von Jokela et al. eine gehäufte homozygote Ausprägung als Erklärung für den Phänotyp.

Patient 04 (p.L168insX)

Eine auffällige Blutungsanamnese besteht nicht. Jedoch zeigt sich eine positive Familienanamnese. Die Tochter der Patientin hat ein vWS Typ3. Der Phänotyp passt gut zu einem vWS Typ1. Es wurden gezielt die Exons vier; fünf und 17 sequenziert. Es fand sich eine der zwei Mutationen der Tochter in heterozygoter Ausprägung. Es entsteht ein verkürztes Protein. Das gesunde Allel sorgt für eine ausreichenden Antigenkonzentration. Bei der Tochter besteht eine gemischt heterozygote Situation. Die Mutation auf dem zweiten Allel (het.c.2269_2270delCT; Stop AA 778) müsste beim Vater zu finden sein. Die gemischt heterozygote Situation erklärt den Phänotyp eines vWS Typ 3 bei der Tochter hinreichend. Bei der Mutter zeigt sich die Mutation und die auffälligen Laborwerte, welche zu einem vWS Typ 1 passen können. Jedoch kann man diskutieren, ob die Diagnose vWS Typ 1 bei unauffälliger Blutungsanamnese gerechtfertigt ist. Ob der Vater die zweite Mutation hat und ob er auch wie die Mutter ein vWS Typ 1 hat, ist nicht bekannt. In der Literatur und den Datenbanken ist diese Mutation bislang nicht beschrieben.

Patient 05 (c.4042_4062dup; p.Lys1348_Val1354dup)

In diesem Fall zeigt sich ein zu einem vWS Typ 1 passender Phänotyp. In Exon 28 zeigt sich eine Mutation, welche bislang in der Literatur und den Datenbanken nicht beschrieben wurde. Über die Bedeutung dieser Mutation gibt es keinerlei Aussagen. Zusätzlich ist bei der Patientin ein Faktor XII Mangel bekannt. Es konnte ein klinisch relevanter Polymorphismus in Exon 1 des Faktor XII-Gens in heterozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Der Phänotyp passt zu einem vWS Typ 1.

Patient 06 (p.Gly2518Ser)

In diesem Fall zeigt sich eine typische Blutungsanamnese bei positiver Familienanamnese. Die Mutter der Patientin hat ein gesichertes vWS Typ1. Der Phänotyp passt zu einem vWS Typ1. Es erfolgte die gezielte Sequenzierung von Exon 45. Es konnte die gleiche Mutation wie bei der Mutter in heterozygoter Ausprägung gefunden werden. Die Pathogenitätsanalyse zeigt eine klinische Relevanz.

Goodeve et al. beschrieben 2007 die Missense Mutation c.7552G>A bei einem Indexpatienten mit einem vWS Typ1. Es zeigt sich eine heterozygote Situation bei diesem Patienten. Aussagen zu Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -funktion werden nicht gemacht. Diese Mutation war bis dato nicht bekannt. (Goodeve et al. 2007)

Da in diesem Fall aufgrund der Familienanamnese lediglich Exon 45 sequenziert wurde, besteht theoretisch die Möglichkeit, dass weitere relevante Veränderungen nicht detektiert wurden. Jedoch erklärt die bei Mutter und Tochter gefundene Mutation den Phänotyp ausreichend.

Patient 07 (p.Tyr1584Cys)

In diesem Fall besteht eine typische Blutungsanamnese. Eine positive Familienanamnese jedoch ohne weiterführende Diagnostik. Das Gerinnungslabor weist bis auf eine dezent verlängerte Blutungszeit für Epinephrin keine pathologischen Werte auf. Es zeigt somit zwar eine Symptomatik, jedoch keine pathologisch veränderten Laborwerte. Im Rahmen der Sequenzierung wurde eine Missense Mutation im Exon 28 gefunden. Diese ist bereits in der Literatur und den Datenbanken bekannt und mit einem vWS Typ 1 assoziiert (James und Lillicrap 2013).

O'Brien et al. führten eine kanadische Studie an 70 Familien durch. Diese waren bereits Teil der kanadischen vWS Typ1 Studie. Die Mutation Tyr1584Cys wurde in 10 von 70 Familien gefunden. Die Multimeranalyse war unauffällig bei den Indexfällen. Der Phänotyp war passend zu einem vWS Typ1. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese des vWF nicht beeinträchtigt wird durch die Substitution. Jedoch zeigt sich eine zusätzliche reaktive Thiolgruppe. Das Resultat ist eine erhöhte Retention des vWF Proteins in der Zelle. Alle Familien zeigten den gleichen Haplotyp. Es wurde der Status als Founder Mutation für ein vWS Typ1 diskutiert. (O'Brien et al. 2003)

Die kanadische Studie von James et al. zeigt die Mutation Tyr1584Cys unter den Indexfällen am häufigsten (18 von 123 Familien). Es ist die A2 Domäne des vWF betroffen. Das mutierte Protein führt letztlich zu einer intrazellulären Retention und erhöhten Proteolyse durch ADAMTS13. So werden die erniedrigten Ag-Konzentrationen erklärt. Im Rahmen der Pathogenitätsanalyse mit SIFT und PolyPhen wird die Mutation als krankheitsverursachend eingestuft. (James et al. 2007)

In der europäischen Studie von Goodeve et al. zeigte sich die Mutation Tyr1584Cys in 8% der Indexfälle. Der Phänotyp zeigt im Gegensatz zu allen anderen Mutationen eine große

Variation. Grund hierfür ist vor allem eine erhöhte Proteolyse durch ADAMTS13. (Goodeve et al. 2007)

Bellissimo et al. fanden die Mutation Tyr1584Cys bei zwei gesunden Probanden (Häufigkeit 1,5%). Einer davon ist Afro-Amerikaner. Der Phänotyp zeigt eine typische Konstellation wie bei einem vWS Typ1 (vWF:RCo leicht erniedrigt, vWF:Ag sowie vWF:CB und FVIII im unteren Normbereich). Die Mutation war bereits zuvor als vWS Typ 1 Mutation bekannt. Die Probanden in dieser Studie hatten alle eine negative Blutungsanamnese. Jedoch wird durch die Häufigkeit und den Phänotyp der Charakter einer Mutation untermauert.

Zusammenfassend zeigt sich in der Literatur eindeutig eine Assoziation mit einem vWS Typ1. Es handelt sich um eine der häufigsten Mutationen. Deswegen wird sie zu Recht als Founder Mutation für das vWS Typ 1 diskutiert. In unserer Arbeit zeigt sich die Mutation in 3 Fällen. Auch wenn die Laborwerte trotz Mehrfachbestimmung nicht typisch verändert sind zeigt sich letztlich eine passende Symptomatik und somit eine Phänotyp – Genotyp Assoziation.

Patient 08 (p.Pro812Argfs*31)

Bei diesem Patienten passen Blutungsanamnese und Laborwerte sehr gut zu einem vWS Typ1. Zudem wurde die bereits bekannte Mutation im Exon 18 gefunden. Die Diskussion der Literaturquellen erfolgte bereits weiter oben. Es zeigt sich in diesem Fall eine eindeutige Phänotyp – Genotyp Assoziation.

Patient 09 (p.Pro812Argfs*31 / p.Arg2185Gln)

Anamnestisch zeigt sich in diesem Fall keine typische Blutungsanamnese. Lediglich die Laborwerte passen zu einem vWS Typ1. In diesem Fall wurden in der Sequenzierung zwei Mutationen gefunden. Die erste Mutation im Exon 18 wurde unter anderem im vorherigen Fall beschrieben und ist bekannt mit einem vWS Typ 1 assoziiert.

Die zweite Variante im Exon 37 ist auch in der Literatur beschrieben.

Bowman et al. fanden bei einem männlichen 66 jährigen Indexpatienten die Variante Arg2185Gln in gemischt heterozygoter Form mit drei Mutationen (p.Met740Ile, p.His1472fs, p.Ser2807fs). Der Phänotyp passt zu einem vWS Typ3 mit subtotal verringerter vWF:Ag-Konzentration. Über die Bedeutung und den Einfluss der 4 Veränderungen und insbesondere der Variante mit Aminosäure-Austausch an Position 2185 auf den Phänotyp in diesem Fall liefert die Studie keine Informationen.(Bowman et al. 2013) In unserer Studie gibt es im

Rahmen der Pathogenitätsanalyse widersprüchliche Aussagen der einzelnen Tools, wie bereits im Ergebnisteil beschrieben wurde.

James et al. fanden die Mutation Arg2185Gln bei einem Patienten. Es wurde eine Pathogenitätsanalyse mit SIFT und PolyPhen durchgeführt. Über den Einfluss dieser Mutation auf Struktur und Funktion des Proteins und somit auf die Entstehung des Phänotyps eines vWS Typ1 gibt es auch wie in unserem Fall keine eindeutige Aussage. (James et al. 2007)

Auch Bellissimo et al. fanden in der amerikanischen Studie die Mutation Arg2185Gln auffällig häufig. Die Studie wurde bereits ausführlich dargestellt. Bei 18% der Afroamerikaner mit unauffälligem Phänotyp und ohne Blutungssymptome wurde die Variante gefunden. Unter den hellhäutigen Personen war die Häufigkeit bei 2,5%. Es zeigt sich hiermit ein signifikanter ethnischer Hintergrund in dieser Studie. Diese Variante wurde bisher als vWs Typ1 Mutation mit unbekannter Signifikanz berichtet. Aufgrund der Häufigkeit in der ethnischen Gruppe der gesunden Afroamerikaner in dieser Studie erscheint eine Deklaration von Arg2185Gln als krankheitsverursachende Mutation als nicht gerechtfertigt. Vielmehr müsste man von einem Polymorphismus ausgehen. (Bellissimo et al. 2012)

Zusammengefasst handelt es sich um eine seltene heterozygote Variante bei Patienten mit diagnostiziertem vWs Typ 1 und 3 im Exon 37. Bei Gesunden Afroamerikanern wurde sie auffällig häufig gefunden. Die Deklaration als krankheitsverursachende Mutation ist möglicherweise nicht zutreffend. In der Pathogenitätsanalyse dieser hochkonservierten Aminosäureposition mit Prediction Tools zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse. Somit bleibt der Einfluss auf die Struktur und Funktion des vWF-Proteins ungeklärt.

Patient 10 (p.Arg924Gln)

In diesem Fall zeigt sich wieder eine typische auffällige Blutungsanamnese und passende pathologisch veränderte Laborwerte im Sinne eines vWS Typ1. In der Sequenzierung konnte die heterozygote Mutation Arg924Gln in Exon 21 gefunden werden. Diese Mutation ist in der Literatur bereits bekannt. Im Rahmen dieser Diskussion wurde diese bereits bei Patient 02 ausführlich abgehandelt. Auf eine erneute Diskussion soll aus diesem Grund verzichtet werden.

Patient 11 (p.Tyr1584Cys)

Die Blutungsanamnese ist auffällig bei negativer Familienanamnese.

Die Laborwerte passen zu einem vWS Typ1. In der Sequenzierung zeigt sich die heterozygote Mutation Tyr1584Cys im Exon 28. Die Literaturergebnisse wurden bereits bei Patient 7 weiter oben diskutiert. Auch in diesem Fall zeigt sich sowohl klinisch als auch im Labor eine eindeutige Kombination wie bei einem vWS Typ1. Diese Befunde werden zuletzt durch die Mutation im Exon 28 untermauert.

Patient 12 (p.Pro812Argfs*31)

Bis auf eine Schwangerschaftsassozierte Blutung ist die Anamnese leer, genauso wie die Familienanamnese. Die Ergebnisse des Gerinnungslabors passen zu einem vWS Typ1. Die Mutation im Exon 18 des vWF Gens wurde bereits bei Patient 3;8 und 9 detailliert besprochen. In diesem Fall wird der Phänotyp durch den Genotyp bestätigt.

Patient 13 (p.Asn1231Thr/ p. Val1229Gly)

Eine typische Blutungsanamnese in Kombination mit pathologisch veränderten Laborwerten weisen auf einen vWS Typ1 Phänotyp hin. Die Mutter hat ein gesichertes vWS Typ1. In der Sequenzierung zeigt sich eine gemischt heterozygote Situation. Die Mutation Asn1231Thr wurde bereits bei Patient 1 detailliert berichtet. In der Literatur ist ein gemeinsames Auftreten mit der Mutation Val1229Gly wie auch in diesem Fall beschrieben. In den meisten Fällen liegen beide Veränderungen auf einem Allel, sodass das gesunde Allel für einen ausreichenden Antigen-Konzentration sorgt.

Eikenboom et al. untersuchten in einer Studie 8 Indexpatienten und deren Familien in der Region Norditalien. In einer Familie wurden die Mutationen Val1229Gly und Asn1231Thr gefunden. Hier zeigten sich in Intron 27 und Exon 28 exakt die gleiche Sequenz im aktiven Gen und im Pseudogen, sodass hier die Möglichkeit einer Genkonversion als Ursache oder Mechanismus der Mutation in Betracht käme. Es wird jedoch in der Studie keine Aussage zum Einfluss dieser Mutationen auf Struktur und Funktion des vWF Proteins gemacht. Diese Mutationen waren bis dato nicht bekannt und deren Auswirkungen somit unklar. (Eikenboom et al. 1998) Auch Bellissimo et al haben diese Mutationen bei Gesunden Personen gefunden. (Bellissimo et al. 2012)

In der Pathogenitätsanalyse in unserer Arbeit zeigt sich zusammengefasst ein eher benigner Charakter der Mutation Val1229Gly ohne Einfluss auf Struktur und Funktion des Proteins.

Patient 14 (p.Asn1231Thr/ p. Val1229Gly)

Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben wurde, handelt es sich hierbei um die Mutter von Patientin 13. Es zeigt sich auch hier eine typische Blutungsanamnese in Kombination mit einem zu einem vWS Typ1 passenden Gerinnungslabor. In der genetischen Analyse zeigen sich die beiden gleichen Mutationen wie bei der Tochter zuvor. Da, wie in der Literatur beschrieben, die Mutationen auf einem Allel liegen, ist anzunehmen, dass die Veränderungen von der Mutter an die Tochter weiter gegeben wurden. Es gibt aus den Krankenakten von Mutter und Tochter keine Informationen zu weiteren betroffenen oder unbetroffenen Familienmitgliedern.

Patient 15 (p. Tyr2483*)

Bei dieser Patientin zeigt sich erneut ein Phänotyp typisch für ein vWS Typ1. Die heterozygote Mutation an Position 7449 im Exon 44 führt zu einer Leserasterverschiebung und zu einem Kettenabbruch an Aminosäureposition 2483. Diese Mutation ist bislang in der Literatur und in den Datenbanken nicht beschrieben. Eine Pathogenitätsanalyse ist bei Kettenabbruch nicht möglich. Jedoch zeigen sich an früheren Positionen Mutationen, welche mit einem vWS Typ1 assoziiert sind (p.Arg 2535*; p.Gln2544*)

Patient 16 (p.Arg924Gln)

Klinisch zeigt sich eine typische Blutungsanamnese. Laborchemisch ist lediglich die Verschlusszeit verlängert. Die Sequenzierung des vWF Gens zeigt die heterozygote Mutation c.2771G>A im Exon 21. Diese wurde bereits ausführlich bei Patient 02 erläutert. Wie im Ergebnisteil beschrieben, ergibt unsere Pathogenitätsanalyse ein klinisch nicht relevantes Ergebnis. Die gefundene Mutation ist jedoch in der Literatur mit einem vWS Typ1 assoziiert.

Patient 17 (p.Pro2063Ser)

Die Patientin hat eine auffällige Blutungsanamnese. Zudem ist die Familienanamnese auffällig. Der Bruder zeigt Blutungssymptome, jedoch ohne weiterführende Diagnostik. Die Laborwerte passen zu einem vWS Typ1. Der Genotyp zeigt die heterozygote Mutation in Exon 36. Zu dieser Mutation gibt es insgesamt 4 Einträge in der LOVD (Leiden Open Variation Database). Der erste Eintrag stammt aus der östlichen Türkei. Die Mutation wurde wohl in 29 Familien mit positiver Blutungsanamnese und einem vWS Typ 1 oder 3 gefunden. Eine Veröffentlichung hierzu gibt es nicht.

Goodeve et al. fanden in der europäischen vWS Typ 1 Studie diese Mutation bei einem Indexpatienten in gemischt heterozygoter Form. Der Patient entstammt der Gruppe 2 mit

unauffälligen Multimeren, auffälliger Blutungsanamnese und einem Phänotyp passend zu einem vWS Typ1. Die zweite Missensemutation bei dem Patienten ist die p.Arg2287Trp. Dies war eine neue Mutation. Eine Bewertung der Mutation wurde in dieser Studie nicht vorgenommen. (Goodeve et al. 2007)

In der kanadischen vWS Typ 1 Studie von James et al. wurde die Mutation in drei Fällen detektiert. In der Pathogenitätsanalyse dieser heterozygoten Veränderung im Exon 36 zeigt sich ein krankheitsverursachender Charakter. Die Häufigkeit in gesunden nicht betroffenen Familienmitgliedern konnte aufgrund der zu niedrigen Fallzahl nicht erfolgen. (James et al. 2007)

Bellissimo et al. jedoch fanden auch bei gesunden Personen diese Mutation. Eine Häufigkeit von 1,7% untermauert den Charakter einer Mutation. Es zeigt sich in dieser Studie auch kein signifikanter Unterschied zwischen den ethnischen Gruppen Afro-Amerikaner und Weiße. (Bellissimo et al. 2012)

In unserer Arbeit wurde im Rahmen der Pathogenitätsanalyse mit den 4 Prediction Tools eine deutliche klinische Relevanz gezeigt. Somit besteht kein Zweifel, dass diese Mutation mit einem vWS Typ 1 assoziiert ist.

Patient 18 (p.Arg924Gln)

Die Patientin zeigt eine interessante Anamnese. Zum einen werden typische Blutungssymptome berichtet. Zum anderen hat die Patientin einen Faktor XII Mangel und in der Familie ist eine Kugelzellanämie bekannt. Die Laborergebnisse lassen nicht an ein vWS Typ1 denken. Die Sequenzierung des Faktor XII Gens zeigt einen nicht relevanten Polymorphismus und eine zweite Veränderung, die einen Aminosäuretausch verursacht und deren Signifikanz bislang nicht bewertet werden kann.

Im vWF Gen wurde die heterozygote Mutation im Exon 21 gefunden. Diese Mutation wurde bereits bei Patient 02 ausführlich erläutert. Eine Assoziation mit einem milden vWS Typ1 und wird von Hickson et al. berichtet. Die Blutungssymptome des Bruders lassen an eine hereditäre Komponente denken. Jedoch ist hier keine Diagnostik erfolgt. (Hickson et al. 2010) Die Pathogenitätsanalyse in unserer Arbeit zeigt ein klinisch nicht relevantes Ergebnis. Dies wird durch die Laborwerte in diesem Fall untermauert. Zudem ist der Einfluss des Faktor XII Mangels und der gefundenen Mutation im Faktor XII Gen unklar.

Patient 19 (p.Arg924Gln)

In diesem Fall zeigt sich wiederum ein typischer Phänotyp für ein vWS Typ1. Dazu zeigt sich die heterozygote Mutation im Exon 21 des vWF Gens. Es zeigt sich in der Literatur eine Assoziation mit einem vWS Typ1. In diesem Fall besteht kein Zweifel an der Diagnose eines vWS Typ1.

Patient 20 (p.Met576Ile)

Der Phänotyp passt in diesem Fall zu einem vWS Typ1. Die Sequenzierung des vWF Gens zeigt die heterozygote Mutation in Exon 14.

In der kanadischen Studie von James et al. zeigt sich die Missense Mutation in einem Fall bei einem Indexpatienten mit einem vWS Typ1. Es wurde eine Pathogenitätsanalyse mit SIFT und PolyPhen durchgeführt. Das Ergebnis zeigt keinen Krankheitswert. (James et al. 2007) Diese Aussage deckt sich mit unserem Ergebnis. Die ausgetauschte Aminosäureposition 576 ist nur schwach konserviert. Die ausgetauschten Aminosäuren zeigen nur geringe physikochemische Unterschiede. Insgesamt ist somit der Einfluss dieser heterozygoten Veränderung auf den Phänotyp aufgrund der sehr begrenzten Fallzahl in der Analyse wahrscheinlich nicht aussagekräftig genug. In der LOVD gibt es keine weiteren Einträge. Insgesamt lässt jedoch der typische Phänotyp an ein vWS Typ1 denken.

Patient 21 (p.Lys2075ASnfs*16)

Die Veränderung ist bisher nicht bekannt. Es gibt keinen Eintrag in der LOVD. Die Insertion von 4 Basen führt zur Leserasterverschiebung und Generierung eines Stoppkodons an Aminosäureposition 2090. Bei heterozygoter Ausprägung gibt es folglich ein gesundes Allel, welches die vWF:Ag-Konzentration immerhin auf niedrig normalem Level hält. Der Phänotyp kann zu einem vWS Typ1 passen, obgleich die Blutungsanamnese mit der Neigung zu Hämatomen nicht in erster Linie an ein vWS Typ 1 denken lässt. Aufgrund des Kettenabbruchs entsteht ein verkürztes Protein und ihm fehlt unter anderem die Dimerisationsregion. Trotz fehlender Pathogenitätsanalyse ist ein Einfluss auf die Struktur und Funktionalität des Proteins wahrscheinlich. Eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp ist, wenn auch nicht bewiesen, jedoch durchaus denkbar.

Patient 22 (p.Gly2705Arg)

In diesem Fall sieht man eine typische Blutungsanamnese und typische Laborergebnisse für ein vWS Typ1. Jedoch im Hinblick auf die gefundene heterozygote Mutation in Exon 49

wären die Ergebnisse des vWFpp interessant gewesen. Dieser Parameter wurde jedoch nicht bestimmt.

In der italienischen Studie von Szutkowska et al. wurden 36 Patienten mit einem vWS (22 vWS Typ 1 und 14 vWS Typ Vicenza) und 30 gesunde Personen untersucht. Um in den unterschiedlichen Gruppen die Halbwertszeit des vWF zu untersuchen, erhielten alle Patienten und Kontrollpersonen DDAVP. Ein Patient in der Gruppe mit „normalem“ vWS Typ1 zeigte die Mutation Gly2705Arg in heterozygoter Ausprägung in Exon 49. In diesem Fall zeigte sich eine Halbwertszeit von 8,9 h (Mittelwert in dieser Gruppe bei 11,6 h versus Gruppe Vicenza bei 1,3 h).

Somit ist diese Mutation zwar mit einem vWS Typ 1 jedoch nicht mit einer deutlich kürzeren Halbwertszeit vergesellschaftet. (Sztukowska et al. 2008) In unserer Arbeit zeigte sich ein Phänotyp eines vWS Typ1 mit der heterozygoten Mutation Gly2705Arg. Die Pathogenitätsanalyse zeigt eine klinische Relevanz. Jedoch der Pathomechanismus hinter dem Phänotyp bleibt unklar. Zur Klärung sind weitere Untersuchungen nötig.

In der LOVD gibt es zu der Mutation Gly2705Arg zwei Einträge. Einer davon ist bislang nicht publiziert. Der zweite Eintrag gibt als Literaturquelle die englische Studie von Cumming et al. an. Jedoch wird in diesem Artikel eben die Mutation nicht erwähnt. (Cumming et al. 2006) Weitere Literaturquellen finden sich nicht.

Patient 23 (p.Pro812Argfs*31/ p.Arg854Gln)

Der Phänotyp kann in diesem Fall zu einem vWS Typ1 passen. In der Sequenzierung des vWF Gens zeigen sich zwei heterozygote Mutationen auf einem Allel. Die Mutation p.Pro812Argfs*31 ist mit einem vWS Typ 1 assoziiert. Aufgrund des Kettenabbruchs ist eine Pathogenitätsanalyse nicht möglich. Die Diskussion der Literaturergebnisse erfolgte bereits ausführlich bei Patient 03.

Die zweite Mutation Arg854Gln ist ebenfalls in der Literatur bekannt und mit einem vWS Typ1 assoziiert. Enayat et al. haben in einer britischen Studie eine iranische und eine britische Familie mit je einem Indexpatienten für vWS untersucht (insgesamt 19 Individuen). In zwei Fällen wurde eine gemischt heterozygote Situation für c.2365G>C/ c.2561G>A gefunden. Es zeigte sich eine moderat erniedrigte vWF:FVIIIIB und ein vWS Typ 2N. Die Mutationen lagen auf getrennten Allelen. Für die Mutation Arg854Gln in heterozygoter Ausprägung zeigte sich in einem Fall eine normale vWF:FVIIIIB. (Enayat et al. 2010)

Kroner et al. zeigten in ihrer Studie von 1991, dass die Mutation Arg854Gln eine erniedrigte Faktor VIII-Bindung hervorruft und somit eine damals neue Variante des vWS erklärt werden konnte. Hierfür wurden sechs Personen einer Familie untersucht. Alle Personen hatten eine erniedrigte Faktor VIII-Bindung und trugen diese Missense Mutation. (Kroner et al. 1991)

In der französischen Studie von Mazurier et al. wurden acht Patienten mit einer deutlich reduzierten vWF: FVIII:B und einer deutlich reduzierten FVIII:C untersucht. Die PTT war deutlich verlängert. Diese Fälle wurden zuvor als Hämophilie A missinterpretiert. Nach genetischer Analyse der Exons 18-24 zeigten sich vor allem 3 Missense Mutationen. Eine davon war die Arg854Gln in heterozygoter Situation. Das mutierte und das Wildtyp Protein wurden verglichen. Das mutierte Protein zeigte in allen 3 Fällen eine deutlich reduzierte FVIII Bindungskapazität. Der neue vWS Typ wurde als „Normandy“ (vWD Typ 2N) bezeichnet. (Mazurier 1992)

Die niederländische Studie von Peerlinck et al. zeigen die Ergebnisse von einer 23 jährigen Patientin mit einem klinischen vWS Typ1 und negativer Familienanamnese. Jedoch zeigte sich dazu noch eine erniedrigte FVIII:C und eine erniedrigte vWF:FVIII:B. Es zeigte sich die Mutation c.2561G>A in einem Allel und ein deutlich erniedrigtes Transkript Level des zweiten Allels ohne Mutation (silent Allel). Diese Kombination ist typisch. Es konnte bestätigt werden, dass dadurch die FVIII Bindungskapazität erniedrigt ist. Das „stille“ Allel resultiert in erniedrigten mRNA Konzentrationen. In homozygoter Situation entsteht so ein vWS Typ3. (Peerlinck et al. 1992)

In der niederländischen Studie von Eikenboom et al. wurden vier Indexpatienten mit einem vWSTyp1 und deren Familien untersucht. Eine Indexpatientin wurde ausführlich in der Studie von Peerlinck et al. beschrieben. In dieser Studie jedoch fand sich die Mutation in drei Familien. In heterozygoter Ausprägung zeigt sich kein vWS Typ1 Phänotyp, jedoch eine erniedrigte FVIII Bindungskapazität. In gemischt heterozygoter Ausprägung mit einem stillen Allel zeigt sich dann jedoch ein erniedrigter vWF:Ag und vWF:RCO Spiegel. Hier wird jeweils nur das mutierte Allel exprimiert. (Eikenboom et al. 1998)

In unserem Fall zeigt sich in der Tat auch eine erniedrigte Faktor VIII-Konzentration. Die Faktor VIII:B wurde nicht bestimmt. Jedoch liegt offensichtlich kein „silent allel“ vor. Antigen und Aktivität liegen im unteren Normbereich. Die zweite Mutation für sich genommen erklärt den Phänotyp bereits hinreichend. Der Einfluss der ersten Mutation auf den

Phänotyp ist laut Literatur auch unbestritten. Ob möglicherweise ein gegenseitiger Effekt beider Mutationen besteht ist unklar.

Patient 24 (p.Tyr1584Cys)

Bei dieser Patientin besteht ein Phänotyp der zu einem vWS Typ1 passt. Im vWF-Gen konnte in Exon 28 die heterozygote Mutation gefunden werden. Diese wurde bereits bei Patient 7 ausführlich diskutiert. Der Phänotyp eines vWS Typ1 ist durch den Genotyp gut erklärt.

Patient 25 (p.Gly2518Ser)

In diesem Fall zeigt sich eine auffällige Blutungsanamnese und die Familienanamnese ist positiv. Die Tochter der Patientin hat ein vWS Typ1. In der Krankenakte gab es jedoch keinerlei Hinweise über gefundene Mutationen bei der Tochter. Unsere Patientin zeigt jedenfalls einen gut passenden Phänotyp für ein vWS Typ1. Die Sequenzierung zeigt die heterozygote Mutation in Exon 45. Diese wurde bereits bei Patient 6 ausführlich besprochen. Somit ist der Phänotyp durch den Genotyp durchaus erklärt.

Patient 26 (p.Gly2705Arg)

Bei der Patientin und bei mehreren Familienmitgliedern zeigen sich typische Blutungssymptome vom mukokutanen Typ. Bei den Familienmitgliedern wurde bislang keine Diagnostik durchgeführt. Die Laborwerte passen zu einem vWS Typ1. Die Faktor VIII-Konzentration liegt in diesem Fall im Normbereich. Die heterozygote Mutation im Exon 49 wurde bereits bei Patient 22 ausführlich diskutiert. Zusammengefasst erklärt der Genotyp den Phänotyp sehr gut.

Patient 27 (p.Arg924Gln)

Bei der Patientin zeigt sich eine auffällige Blutungsanamnese. Zusätzlich ist bei der Patientin und auch familiär ein Faktor XII Mangel bekannt. Die Laborwerte sind bei normwertiger Verschlusszeit nicht eindeutig passend für ein vWS Typ1. Die heterozygote Mutation in Exon 21 ist in der Literatur bekannt und wurde bereits bei Patient 2 ausführlich dargestellt. In Zusammenschau der Befunde erklärt der Genotyp den Phänotyp nicht einwandfrei. Auf der anderen Seite ist der Einfluss des Faktor XII Mangels oder eine wechselseitige Beeinflussung unklar. Ohne Zweifel hat die Patientin eine Blutungssymptomatik die zu einem vWS Typ1 passt. Jedoch kann die Diagnose durchaus in Frage gestellt werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 27 Patienten mit einem vWS Typ1 im Alter zwischen 14 und 70 Jahren retrospektiv analysiert. Es handelt sich um eine Kohortenanalyse aus der Region Nordostdeutschland. Alle Patienten stellten sich in der hämostaseologischen Ambulanz am Klinikum Südstadt Rostock vor. 25 weibliche und zwei männliche Patienten wurden eingeschlossen. In 25 Fällen zeigte sich eine auffällige Blutungsanamnese. Im Labor zeigte sich in 25 von 27 Fällen ein für ein vWS Typ1 typischer Phänotyp (VZ; vWF:Ag; vWF:Akt.; FVIII:C; CBA; Multimerenanalyse). Bei allen Patienten wurde eine molekulargenetische Diagnostik durchgeführt. In 25 Fällen wurden alle 52 Exons und die Intron-/ Exon Übergänge mit der Sequenzierung nach Sanger untersucht.

Bei allen Patienten wurden Mutationen im vWF-Gen gefunden. Insgesamt zeigten sich 15 unterschiedliche Veränderungen. Vier davon sind bislang nicht publiziert. Bei 25 Patienten zeigte sich eine heterozygote und bei drei Patienten zwei heterozygote Veränderungen. 20 von insgesamt 31 Mutationen in der Population betreffen die Exons 18, 21 und 28. Somit zeigte sich hier eine Häufung (64%). Für 11 Mutationen war eine softwaregestützte Pathogenitätsanalyse durchführbar. SIFT, PolyPhen2, aGVGD und Mutation Taster wurden hierfür benutzt. Die Ergebnisse waren in den meisten Fällen konkordant.

Ausgehend von der typischen Konstellation aus mukokutaner Blutungsneigung und dem Phänotyp, wurde die für das vWF Typ 1 bekannte genetische Heterogenität auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Es wurden zudem vier bislang unpublizierte Mutationen gefunden. Es zeigt sich eine Häufung in den Exons 18, 21 und 28 (64 % der Mutationen). Der Nutzen einer molekulargenetischen Stufendiagnostik im klinischen Alltag sollte weiter untersucht werden. Die Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse sind in der Interpretation der Mutationen im klinischen Kontext in der Mehrzahl der Fälle hilfreich.

6 Literaturverzeichnis

Adzhubei, Ivan; Jordan, Daniel M.; Sunyaev, Shamil R. (2013): Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. In: *Current protocols in human genetics* Chapter 7, Unit7.20. DOI: 10.1002/0471142905.hg0720s76.

Baronciani, Luciano; Cozzi, Giovanna; Canciani, Maria Teresa; Peyvandi, Flora; Srivastava, Alok; Federici, Augusto B.; Mannucci, Pier Mannuccio (2003): Molecular defects in type 3 von Willebrand disease. Updated results from 40 multiethnic patients. In: *Blood cells, molecules & diseases* 30 (3), S. 264–270.

Bartoli, Carlo R.; Restle, David J.; Zhang, David M.; Acker, Michael A.; Atluri, Pavan (2015): Pathologic von Willebrand factor degradation with a left ventricular assist device occurs via two distinct mechanisms. Mechanical demolition and enzymatic cleavage. In: *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 149 (1), S. 281–289. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.09.031.

Battle, Javier; Pérez-Rodríguez, Almudena; Corrales, Irene; López-Fernández, María Fernanda; Rodríguez-Trillo, Ángela; Lourés, Esther et al. (2017): Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM–EVW–ES). Proposal for a new diagnostic paradigm. In: *Thrombosis and haemostasis* 115 (01), S. 40–50. DOI: 10.1160/TH15-04-0282.

Bellissimo, Daniel B.; Christopherson, Pamela A.; Flood, Veronica H.; Gill, Joan Cox; Friedman, Kenneth D.; Haberichter, Sandra L. et al. (2012): VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. In: *Blood* 119 (9), S. 2135–2140. DOI: 10.1182/blood-2011-10-384610.

Bodó, I.; Katsumi, A.; Tuley, E. A.; Eikenboom, J. C.; Dong, Z.; Sadler, J. E. (2001): Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers. A possible general mechanism for dominant mutations of oligomeric proteins. In: *Blood* 98 (10), S. 2973–2979. DOI: 10.1182/blood.v98.10.2973.

Bowman, M.; Tuttle, A.; Notley, C.; Brown, C.; Tinlin, S.; Deforest, M. et al. (2013): The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease. Further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11 (3), S. 512–520. DOI: 10.1111/jth.12130.

- Budde, U.; Schneppenheim, R.; Eikenboom, J.; Goodeve, A.; Will, K.; Drewke, E. et al. (2008): Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6 (5), S. 762–771. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.02945.x.
- Castaman, Giancarlo; Lethagen, Stefan; Federici, Augusto B.; Tosetto, Alberto; Goodeve, Anne; Budde, Ulrich et al. (2008): Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD). Results from the European Study MCMDM-1VWD. In: *Blood* 111 (7), S. 3531–3539. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109231.
- Chapin, John (2018): Von Willebrand disease in the elderly. Clinical perspectives. In: *Clinical interventions in aging* 13, S. 1531–1541. DOI: 10.2147/CIA.S136931.
- Conlan, M. G.; Folsom, A. R.; Finch, A.; Davis, C. E.; Sorlie, P.; Marcucci, G.; Wu, K. K. (1993): Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. In: *Thrombosis and haemostasis* 70 (3), S. 380–385.
- Coppola, Raffaella; Mari, Daniela; Lattuada, Antonella; Franceschi, Claudio (2003): Von Willebrand factor in Italian centenarians. In: *Haematologica* 88 (1), S. 39–43.
- Cumming, Anthony; Grundy, Pamela; Keeney, Stephen; Lester, William; Enayat, Said; Guilliatt, Andrea et al. (2006): An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. In: *Thrombosis and haemostasis* 96 (5), S. 630–641.
- Echahdi, Hanae; El Hasbaoui, Brahim; El Khorassani, Mohamed; Agadr, Aomar; Khattab, Mohamed (2017): Von Willebrand's disease. Case report and review of literature. In: *The Pan African medical journal* 27, S. 147. DOI: 10.11604/pamj.2017.27.147.12248.
- Eikenboom, J. C.; Castaman, G.; Vos, H. L.; Bertina, R. M.; Rodeghiero, F. (1998): Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. In: *Thrombosis and haemostasis* 79 (4), S. 709–717.
- Eikenboom, J. C.; Reitsma, P. H.; Peerlinck, K. M.; Briët, E. (1993): Recessive inheritance of von Willebrand's disease type I. In: *Lancet (London, England)* 341 (8851), S. 982–986.

Enayat, M. S.; Guilliatt, A. M.; Short, P. E.; Rastegar-Lari, G.; Jazebi, M.; Ravonbod, S. et al. (2010): A novel alanine or threonine 789 to proline mutation causing type 2N von Willebrand's disease when inherited homozygously or heterozygously with arginine 854 to glutamine mutation. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 16 (6), S. 966–969. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2010.02271.x.

Federici, Augusto B.; Lee, Christine A.; Berntorp, Erik E. (2011): Von Willebrand Disease. Basic and Clinical Aspects: John Wiley & Sons.

Gill, J. C.; Endres-Brooks, J.; Bauer, P. J.; Marks, W. J.; Montgomery, R. R. (1987): The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. In: *Blood* 69 (6), S. 1691–1695.

Goodeve, Anne; Eikenboom, Jeroen; Castaman, Giancarlo; Rodeghiero, Francesco; Federici, Augusto B.; Batlle, Javier et al. (2007): Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). In: *Blood* 109 (1), S. 112–121. DOI: 10.1182/blood-2006-05-020784.

Haberichter, Sandra L.; Castaman, Giancarlo; Budde, Ulrich; Peake, Ian; Goodeve, Anne; Rodeghiero, Francesco et al. (2008): Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study. Molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). In: *Blood* 111 (10), S. 4979–4985. DOI: 10.1182/blood-2007-09-110940.

Hickson, N.; Hampshire, D.; Winship, P.; Goudemand, J.; Schneppenheim, R.; Budde, U. et al. (2010): von Willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduced von Willebrand factor and factor VIII levels. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 8 (9), S. 1986–1993. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03927.x.

Hilbert, Lysiane; Jorieux, Sylvie; Proulle, Valérie; Favier, Rémi; Goudemand, Jenny; Parquet, Armelle et al. (2003): Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. In: *British journal of haematology* 120 (4), S. 627–632.

James, P. D.; Lillicrap, D. (2013): The molecular characterization of von Willebrand disease. Good in parts. In: *British journal of haematology* 161 (2), S. 166–176. DOI: 10.1111/bjh.12249.

James, Paula D.; Lillicrap, David (2012): von Willebrand disease. Clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. In: *American journal of hematology* 87 Suppl 1, S4-11. DOI: 10.1002/ajh.23142.

James, Paula D.; Notley, Colleen; Hegadorn, Carol; Leggo, Jayne; Tuttle, Angie; Tinlin, Shawn et al. (2007): The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease. Results from a Canadian cohort study. In: *Blood* 109 (1), S. 145–154. DOI: 10.1182/blood-2006-05-021105.

James, Paula; Lillicrap, David (2008): The role of molecular genetics in diagnosing von Willebrand disease. In: *Semin Thromb Hemost* 34 (6), S. 502–508. DOI: 10.1055/s-0028-1103361.

Jokela, V.; Lassila, R.; Szanto, T.; Joutsu-Korhonen, L.; Armstrong, E.; Oyen, F. et al. (2013): Phenotypic and genotypic characterization of 10 Finnish patients with von Willebrand disease type 3. Discovery of two main mutations. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 19 (6), e344-8. DOI: 10.1111/hae.12225.

Jong, Annika de; Eikenboom, Jeroen (2017): Von Willebrand disease mutation spectrum and associated mutation mechanisms. In: *Thrombosis research* 159, S. 65–75. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.09.025.

Konkle, Barbara A.; Huston, Haley; Nakaya Fletcher, Shelley (1993): GeneReviews®. Hemophilia A. Hg. v. Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya. Seattle (WA).

Kroner, P. A.; Friedman, K. D.; Fahs, S. A.; Scott, J. P.; Montgomery, R. R. (1991): Abnormal binding of factor VIII is linked with the substitution of glutamine for arginine 91 in von Willebrand factor in a variant form of von Willebrand disease. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (29), S. 19146–19149.

- Lapecorella, M.; Mariani, G. (2008): Factor VII deficiency. Defining the clinical picture and optimizing therapeutic options. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (6), S. 1170–1175. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01844.x.
- Lassila, R.; Lindberg, O. (2013): Erik von Willebrand. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 19 (5), S. 643–647. DOI: 10.1111/hae.12243.
- Lavin, Michelle; Aguila, Sonia; Schneppenheim, Sonja; Dalton, Niall; Jones, Kenneth L.; O'Sullivan, Jamie M. et al. (2017): Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying low VWF levels. In: *Blood* 130 (21), S. 2344–2353. DOI: 10.1182/blood-2017-05-786699.
- Leebeek F.W.G., Eikenboom J.C.J.: von Willebrand's disease. In: *NJEM* 2016 (375), S. 2067–2080.
- Liu, L.; Wang, X.; Lin, Z.; Wu, H. (1993): Elevated plasma levels of VWF:Ag in hyperthyroidism are mediated through beta-adrenergic receptors. In: *Endocrine research* 19 (2-3), S. 123–133.
- Luciano Baronciani, Francesca Stufano, Flora Peyvandi (2017): Diagnosis of von Willebrand Disease: Phenotypic Characterization. World Federation of Hemophilia. Online verfügbar unter <https://elearning.wfh.org/resource/diagnosis-von-willebrand-disease-phenotypic-characterization/>.
- Mannucci, P. M. (1998): Treatment of von Willebrand disease. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 4 (4), S. 661–664.
- Mazurier, C. (1992): von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. In: *Thrombosis and haemostasis* 67 (4), S. 391–396.
- Mezzano, D.; Quiroga, T. (2019): Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders. A bait for poorly explored clinical and basic research. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17 (2), S. 257–270. DOI: 10.1111/jth.14363.
- Michiels, Jan Jacques; Gadisseur, Alain; Budde, Ulrich; Berneman, Zwi; van der Planken, Marc; Schroyens, Wilfried et al. (2005): Characterization, Classification, and Treatment of von Willebrand Diseases. A Critical Appraisal of the Literature and Personal Experiences. In: *Semin Thromb Hemost* 31 (05), S. 577–601. DOI: 10.1055/s-2005-922230.

- Mikhail, Sameh; Aldin, Ehab Saad; Streiff, Michael; Zeidan, Amer (2014): An update on type 2B von Willebrand disease. In: *Expert Review of Hematology* 7 (2), S. 217–231. DOI: 10.1586/17474086.2014.868771.
- Mohl, A.; Boda, Z.; Jager, R.; Losonczy, H.; Marosi, A.; Masszi, T. et al. (2011): Common large partial VWF gene deletion does not cause alloantibody formation in the Hungarian type 3 von Willebrand disease population. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9 (5), S. 945–952. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04250.x.
- Ng, Christopher J.; Di Paola, Jorge (2018): von Willebrand Disease. Diagnostic Strategies and Treatment Options. In: *Pediatric clinics of North America* 65 (3), S. 527–541. DOI: 10.1016/j.pcl.2018.02.004.
- Ng, Pauline C.; Henikoff, Steven (2003): SIFT. Predicting amino acid changes that affect protein function. In: *Nucleic acids research* 31 (13), S. 3812–3814.
- Nichols, W. L.; Hultin, M. B.; James, A. H.; Manco-Johnson, M. J.; Montgomery, R. R.; Ortel, T. L. et al. (2008): von Willebrand disease (VWD). Evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (2), S. 171–232. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x.
- Nilsson (1999): Commentary to Erik von Willebrand's original paper from 1926 'Hereditär pseudohemofili'. In: *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 5 (3), S. 220–221. DOI: 10.1046/j.1365-2516.1999.0320a.x.
- O'Brien, Lee A.; James, Paula D.; Othman, Maha; Berber, Ergul; Cameron, Cherie; Notley, Colleen R. P. et al. (2003): Founder von Willebrand factor haplotype associated with type 1 von Willebrand disease. In: *Blood* 102 (2), S. 549–557. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3693.
- Peake, I.; Goodeve, A. (2007): Type 1 von Willebrand disease. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1, S. 7–11. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02488.x.
- Peerlinck, K.; Eikenboom, J. C.; van Ploos Amstel, H. K.; Sangtawesin, W.; Arnout, J.; Reitsma, P. H. et al. (1992): A patient with von Willebrand's disease characterized by a compound heterozygosity for a substitution of Arg854 by Gln in the putative factor-VIII-binding domain of von Willebrand factor (vWF) on one allele and very low levels of mRNA from the second vWF allele. In: *British journal of haematology* 80 (3), S. 358–363.

Pottinger, B. E.; Read, R. C.; Paleolog, E. M.; Higgins, P. G.; Pearson, J. D. (1989): von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. In: *Thrombosis research* 53 (4), S. 387–394.

Rana, Mohammad Atif; Vutukuri, Naga M.; Acharya, Madan M.; Akkus, Nuri I. (2014): Acute coronary syndrome and coronary intervention in a patient with type 2M von Willebrand disease. In: *International Journal of Cardiology* 176 (2), S. 484–485. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.06.066.

Renné, Thomas; Pozgajová, Miroslava; Grüner, Sabine; Schuh, Kai; Pauer, Hans-Ulrich; Burfeind, Peter et al. (2005): Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (2), S. 271–281. DOI: 10.1084/jem.20050664.

Rodeghiero, F.; Castaman, G.; Dini, E. (1987): Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. In: *Blood* 69 (2), S. 454–459.

Ruggeri, Z. M.; Zimmerman, T. S. (1987): von Willebrand factor and von Willebrand disease. In: *Blood* 70 (4), S. 895–904.

Sabater-Lleal, Maria; Huffman, Jennifer E.; Vries, Paul S. de; Marten, Jonathan; Mastrangelo, Michael A.; Song, Ci et al. (2019): Genome-Wide Association Transethnic Meta-Analyses Identifies Novel Associations Regulating Coagulation Factor VIII and von Willebrand Factor Plasma Levels. In: *Circulation* 139 (5), S. 620–635. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034532.

Sadler, J. E.; Budde, U.; Eikenboom, J. C. J.; Favaloro, E. J.; Hill, F. G. H.; Holmberg, L. et al. (2006): Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease. A report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4 (10), S. 2103–2114. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.

Schneppenheim, R.; Federici, A. B.; Budde, U.; Castaman, G.; Drewke, E.; Krey, S. et al. (2000): Von Willebrand Disease type 2M "Vicenza" in Italian and German patients. Identification of the first candidate mutation (G3864A; R1205H) in 8 families. In: *Thrombosis and haemostasis* 83 (1), S. 136–140.

- Schwarz, Jana Marie; Cooper, David N.; Schuelke, Markus; Seelow, Dominik (2014): MutationTaster2. Mutation prediction for the deep-sequencing age. In: *Nature methods* 11 (4), S. 361–362. DOI: 10.1038/nmeth.2890.
- Simeoni, Ilenia; Stephens, Jonathan C.; Hu, Fengyuan; Deevi, Sri V. V.; Megy, Karyn; Bariana, Tadbir K. et al. (2016): A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. In: *Blood* 127 (23), S. 2791–2803. DOI: 10.1182/blood-2015-12-688267.
- Smith, Nicholas L.; Chen, Ming-Huei; Dehghan, Abbas; Strachan, David P.; Basu, Saonli; Soranzo, Nicole et al. (2010): Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor. The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. In: *Circulation* 121 (12), S. 1382–1392. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.869156.
- Solomon, C.; Budde, U.; Schneppenheim, S.; Czaja, E.; Hagl, C.; Schoechl, H. et al. (2011): Acquired type 2A von Willebrand syndrome caused by aortic valve disease corrects during valve surgery. In: *British Journal of Anaesthesia* 106 (4), S. 494–500. DOI: 10.1093/bja/aeq413.
- Swystun, L. L.; Lillicrap, D. (2018): Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 16 (12), S. 2375–2390. DOI: 10.1111/jth.14304.
- Sztukowska, M.; Gallinaro, L.; Cattini, M. G.; Pontara, E.; Sartorello, F.; Daidone, V. et al. (2008): Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 2 von Willebrand disease. In: *British journal of haematology* 143 (1), S. 107–114. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07311.x.
- Zhang, Z.; Blombäck, M.; Anvret, M. (1997): Understanding von Willebrand's disease from gene defects to the patients. In: *Journal of internal medicine. Supplement* 740, S. 115–119.
- Zimmerman, Theodore S.; Ratnoff, Oscar D.; Powell, Arnold E. (1971): Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. In: *J. Clin. Invest.* 50 (1), S. 244–254. DOI: 10.1172/JCI106480.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

aPTT – aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aPTT – aktivierte partielle Thromboplastinzeit
avWS – erworbenes von Willebrand Syndrom
CBA – Kollagen Bindungsaktivität
CrP – C reaktives Protein
ddNTP's - Didesoxynucleotidphosphat
dNTP's – Deoxynucleotidphosphat
EAHAD – The European Association for Haemophilia and Allied Disorders
EDTA – Ethylendiamintetraacetat
ER – endoplasmatisches Retikulum
FVIII:C – Faktor VIII Konzentration
GD – Grantham Distance
GP Ib – Glykoprotein Ib
GV – Grantham Variation
HGMDDB – human gene mutation database
INR – international normalized Ratio
LOVD – Leiden Open Variation Database
MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSA – Multi Sequenz Analyse
NGS – Next Generation Sequencing
nsSNP – Non Synonymous Single Nucleotide Polymorphism
PCR – Polymerase Kettenreaktion
RIPA – Ristocetin induzierte Plättchen Aggregation
SIFT – Sorting Tolerant From Intolerant
SNP – Single Nucleotide Polymorphism
TTP – thrombotisch thrombozytopenische Purpura
vWF – von Willebrand Faktor
vWF: pp – von Willebrand-Faktor Propeptid
vWF: Ag – von Willebrand-Faktor Antigen

vWF: Akt. – von Willebrand-Faktor Aktivität

vWF: FVIII-B – von Willebrand-Faktor: Faktor VIII-Bindung

vWF:CBA – Collagen Bindungskapazität

vWF:RCo – Ristocetin-Cofaktor

vWS – von Willebrand-Syndrom

VZ – Verschlusszeit

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Darstellung der Laborbefunde (Patient 01)	Seite 18
Tabelle 2 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für Mutation c.3692A>C	Seite 19
Tabelle 3 Darstellung der Laborbefunde (Patient 02)	Seite 20
Tabelle 4 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für Mutation c.2771G>A	Seite 21
Tabelle 5 Darstellung der Laborbefunde (Patient 03)	Seite 21
Tabelle 6 Darstellung der Laborbefunde (Patient 04)	Seite 22
Tabelle 7 Darstellung der Laborbefunde (Patient 05)	Seite 24
Tabelle 8 Darstellung der Laborbefunde (Patient 06)	Seite 25
Tabelle 9 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse für Mutation c.7552G>A	Seite 26
Tabelle 10 Darstellung der Laborbefunde (Patient 07)	Seite 27
Tabelle 11 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.4751A>G	Seite 27
Tabelle 12 Darstellung der Laborbefunde (Patient 08)	Seite 28
Tabelle 13 Darstellung der Laborbefunde (Patient 09)	Seite 29
Tabelle 14 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.6554G>A	Seite 30
Tabelle 15 Darstellung der Laborbefunde (Patient 10)	Seite 31
Tabelle 16 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.2771G>A	Seite 31
Tabelle 17 Darstellung der Laborbefunde (Patient 11)	Seite 32
Tabelle 18 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.4751A>G	Seite 33
Tabelle 19 Darstellung der Laborbefunde (Patient 12)	Seite 34
Tabelle 20 Darstellung der Laborbefunde (Patient 13)	Seite 35
Tabelle 21 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c.3686T>G	Seite 36
Tabelle 22 Ergebnisse Pathogenitätsanalyse Mutation c. 3692A>C	Seite 36
Tabelle 23 Darstellung der Laborbefunde (Patient 14)	Seite 37
Tabelle 24 Darstellung der Laborbefunde (Patient 15)	Seite 38
Tabelle 25 Darstellung der Laborbefunde (Patient 16)	Seite 39
Tabelle 26 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.2771G>A	Seite 39
Tabelle 27 Darstellung der Laborbefunde (Patient 17)	Seite 40
Tabelle 28 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.6187C>T	Seite 41
Tabelle 29 Darstellung der Laborbefunde (Patient 18)	Seite 42
Tabelle 30 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c. 2771G>A	Seite 423
Tabelle 31 Darstellung der Laborbefunde (Patient 19)	Seite 43

Tabelle 32 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.2771G>A	Seite 44
Tabelle 33 Darstellung der Laborbefunde (Patient 20)	Seite 45
Tabelle 34 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.1728G>T	Seite 45
Tabelle 35 Darstellung der Laborbefunde (Patient 21)	Seite 46
Tabelle 36 Darstellung der Laborbefunde (Patient 22)	Seite 47
Tabelle 37 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.8113G>A	Seite 47
Tabelle 38 Darstellung der Laborbefunde (Patient 23)	Seite 48
Tabelle 39 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.2561G>A	Seite 49
Tabelle 40 Darstellung der Laborbefunde (Patient 24)	Seite 50
Tabelle 41 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.4751A>G	Seite 51
Tabelle 42 Darstellung der Laborbefunde (Patient 25)	Seite 51
Tabelle 43 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.7552G>A	Seite 52
Tabelle 44 Darstellung der Laborbefunde (Patient 26)	Seite 53
Tabelle 45 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.8113G>A	Seite 53
Tabelle 46 Darstellung der Laborbefunde (Patient 27)	Seite 54
Tabelle 47 Ergebnisse der Pathogenitätsanalyse Mutation c.2771G>A	Seite 55
Tabelle 48 Zusammenfassende Darstellung der Patienten anhand von Geschlecht, Alter sowie der gefundenen genetischen Varianten und der betroffenen Exons. Rot markierte Mutationen konnten im Schrifttum nicht nachgewiesen werden.	Seite 56-57
Tabelle 49 Nachgewiesene Mutationen der vorliegenden Arbeit, sortiert nach Missense-/Nonsense Mutationen sowie Insertionen/Deletionen und Duplikationen. Neue Mutationen sind rot markiert.	Seite 61

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Domänenstruktur des vWF Proteins. Zuordnung der Exons und Verteilung der Mutationen für die Subtypen vWS 1-3	Seite 6
Abbildung 2 Domänenstruktur des vWF sowie der Bindungsstellen molekularer Interaktionspartner. Weiterhin schematische Darstellung der Dimerisation und Multimerisation des Proteins (gestrichelte Linien) über Disulfidbrücken	Seite 8
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Messprinzips der Verschlußzeit mit dem PFA 100 System	Seite 11
Abbildung 4 Sequenzausschnitt der Mutation c.3692A>C	Seite 18
Abbildung 5 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 20
Abbildung 6 Sequenzausschnitt der Mutation c. 2435delC	Seite 21
Abbildung 7 Sequenzausschnitt der Mutation c.7552G>A	Seite 25
Abbildung 8 Sequenzausschnitt der Mutation c.4751A>G	Seite 26
Abbildung 9 Sequenzausschnitt der Mutation c.2435delC	Seite 28
Abbildung 10 Sequenzausschnitt der Mutation c.2435delC	Seite 29
Abbildung 11 Sequenzausschnitt der Mutation c.6554G>A	Seite 29
Abbildung 12 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 31
Abbildung 13 Sequenzausschnitt der Mutation c.4751A>G	Seite 32
Abbildung 14 Sequenzausschnitt der Mutation c.2435delC	Seite 34
Abbildung 15 Sequenzausschnitt der Mutationen c.3686T>G und c. 3692A>C	Seite 35
Abbildung 16 Sequenzausschnitt der Mutationen c.3686T>G und c. 3692A>C	Seite 37
Abbildung 17 Sequenzausschnitt der Mutation c.7449C>G	Seite 38
Abbildung 18 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 39
Abbildung 19 Sequenzausschnitt der Mutation c.6187C>T	Seite 40
Abbildung 20 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 42
Abbildung 21 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 43
Abbildung 22 Sequenzausschnitt der Mutation c.2771G>A	Seite 45
Abbildung 23 Sequenzausschnitt der Variante c.6221_6224dupCCAA	Seite 46
Abbildung 24 Sequenzausschnitt der Mutation c.8113G>A	Seite 47
Abbildung 25 Sequenzausschnitt der Mutation c.2561G>A	Seite 48
Abbildung 26 Sequenzausschnitt der Mutation c.4751A>G	Seite 50
Abbildung 27 Sequenzausschnitt der Mutation c.7552G>A	Seite 51
Abbildung 28 Sequenzausschnitt der Mutation c.8113G>A	Seite 53

Abbildung 29 Sequenzausschnitt der Mutation c2771G>A	Seite 54
Abbildung 30 Zuordnung der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Mutationen zu den Exons. Neue Mutationen sind rot markiert	Seite 59
Abbildung 31 Darstellung der kumulativen Anzahl von (mit Mehrfachnennungen einzelner Mutationen) und den jeweiligen betroffenen Exons des vWF-Gens. Eine Häufung zwischen Exon 18-28 ist ersichtlich	Seite 65
Abbildung 32 Darstellung der insgesamt 15 verschiedenen Mutationen und ihrer Häufigkeiten in der vorliegenden Arbeit	Seite 66

7.4 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock 15. August 2019

Daniel Jenzen

7.5 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. med. Steiner und Frau Dr. med. Krammer - Steiner danke ich herzlichst für die Überlassung des Dissertationsthemas. Ich bedanke mich auch für die Geduld sowie Kritik und die außerordentlich gute Betreuung auch häufig über den Feierabend hinaus.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Medizinischen Labors Rostock, für die Einblicke in die technischen und logistischen Abläufe im Gerinnungslabor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Douglas Friday aus dem MVZ für Humangenetik und Molekularpathologie in Rostock. Die umfassenden Einblicke in die Abläufe der Sequenzierung und Bioinformatik sowie die Aufarbeitung der Daten waren eine Grundlage für diese Arbeit.

Frau Britta Gombert aus der Fachambulanz am Klinikum Südstadt Rostock möchte ich für die häufig auch mehrfache und schnelle Bereitstellung von Patientenakten danken.

Meinen Eltern danke ich für den Glauben an mich und die kritischen sowie motivierenden Worte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Meiner Frau Andrea danke ich für ihre maßlose Geduld und den Zuspruch. Auch unseren Kindern Philipp, Charlotte und Frida danke ich für die Ablenkung und die vielen Stunden, die sie auf mich verzichtet haben.

7.6 Thesen

1. Das von Willebrand-Syndrom (vWS) ist die häufigste angeborene Blutungsneigung und wird in drei Typen eingeteilt.
2. Das vWS Typ 1 ist am häufigsten und zeigt klinisch und in den Gerinnungsbefunden eine erhebliche Variabilität.
3. Anamnestisch stehen bei den meisten Patienten mit einem vWS Typ 1 mukokutane Blutungssymptome, Nachblutungen nach chirurgischen Interventionen und Wundheilungsstörungen im Vordergrund.
4. Die für das vWS Typ 1 charakteristische Laborkonstellation kann vorliegen. Jedoch können die Befunde durch zahlreiche endogene Einflussfaktoren verändert und deren Interpretation erschwert werden.
5. Das vWS Typ 1 ist weitergehend durch eine genetische Heterogenität gekennzeichnet.
6. Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, bei 27 Patienten mit einer vorläufigen Diagnose eines vWS Typ 1 die Diagnose mittels einer molekulargenetischen Analyse (Sanger-Sequenzierung und MLPA) zu bestätigen und den Stellenwert der Gendiagnostik zu überprüfen.
7. Die identifizierten Mutationen schlossen sowohl in der Literatur beschriebene als auch erstmals nachgewiesene (n=4) ein. Es zeigte sich eine Häufung der Mutationen in den Exons 18, 21 und 28.
8. Eine genetische Stufendiagnostik ist bislang für das vWS Typ 1 aufgrund der Heterogenität nicht etabliert, kann jedoch auf der Grundlage der Häufung in bestimmten Exons für die untersuchte nordostdeutsche Population empfohlen werden.
9. Zur Interpretation genetischer Varianten wird die Verwendung mehrerer softwareunterstützter Pathogenitätsanalysen empfohlen. In der vorliegenden Arbeit wurden bei Verwendung von vier Programmen mehrheitlich konkordante Aussagen erreicht.
10. Für die Diagnosestellung eines vWS Typ 1 sollte eine typische Konstellation aus Blutungssymptomen und hämostaseologischen Befunden vorliegen. Einem vWS Typ 1 zugrunde liegende Mutationen im vWF-Gen können die Diagnose bestätigen, sind aber ergänzende, hochspezialisierte Untersuchungen.
11. In der hämostaseologischen Genetik zeichnet sich ein Trend zur Hochdurchsatzanalytik ab (NGS, Panelsequenzierung), der nicht unkritisch gefolgt

werden sollte. Die vorliegende Arbeit zeigt exemplarisch für das vWS Typ 1 im klinischen Alltag, dass auf der Grundlage von Klinik/Symptomatik sowie ausgewählter Gerinnungsanalysen die Fragestellung für die molekulargenetische Analyse vorab spezifiziert werden kann.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Nachname	Jenzen
Vorname	Daniel
Geburtsdatum	05.08.1981
Geburtsort	Schwerin
Wohnort	Rostock
Familienstand	verheiratet
Kinder	drei

Schule/ Ausbildung

1988 - 1992	Grundschule Bad Kleinen
1992 - 2000	Gymnasium Dorf Mecklenburg
Juli 2000	Schulabschluß Allgemeine Hochschulreife
09/2000 - 07/2001	Zivildienst - Medizinisches Zentrum Schwerin Abteilung Hämatologie/ Onkologie
09/2001 – 08/2004	Ausbildung Gesundheits- und Krankenpfleger Medizinisches Zentrum/ Helios Kliniken Schwerin

Studium

Ab 10/2004	Studium Humanmedizin Universität Rostock
09/2006	1. Staatsexamen Humanmedizin
11/2010	2. Staatsexamen Humanmedizin

Beruflicher Werdegang

01 - 08/ 2011	Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum Südstadt Rostock
Ab 09/2011	Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin und Hämatologie und Onkologie, Klinikum Südstadt Rostock

Rostock im August 2019